



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

ROBERTA VALMORBIDA

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays*
L.) E SEUS DERIVADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE
RONDÔNIA, REGIÃO NORTE DO BRASIL**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

ROBERTA VALMORBIDA

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays*
L.) E SEUS DERIVADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE
RONDÔNIA, REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Vildes Maria Scussel

**FLORIANÓPOLIS - SC
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Valmorbida, Roberta

Fungos e Micotoxinas em Grãos de Milho (*Zea mays L.*) e seus Derivados Produzidos no Estado de Rondônia, Região Norte do Brasil / Roberta Valmorbida ; orientadora, Vildes Maria Scussel. Florianópolis – SC – 2016.

151 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referência

1. Ciência dos Alimentos. 2. fungos toxigênicos. 3. *fusarium*. 4. fumonisin. 5. umidade. I. Scussel, Vildes Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Roberta Valmorbida

**FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea may*
L.) E DERIVADOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE RONDÔNIA,
REGIAO NORTE DO BRASIL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 21 de março de 2016.

Prof. Roseane Fett, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Vildes M. Scussel, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Cleide Rosana Werneck Vieira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Elisa Helena Siegel Moecke, Dr.
UNISUL

Prof. César Damiã
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à todas as pessoas que assim como eu, tem o prazer de aprender para então disseminar novos conhecimentos dentre àqueles que não tiveram acesso às informações. Dedico também aos profissionais que primam pelo compromisso com a verdade, com a ciência e se inspiram na busca por soluções à questões relacionadas aos alimentos e riscos eminentes à saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me trazido até aqui, assim como todo o suporte durante esta caminhada e por todo o porvir.

Agradeço também à todos que, indistintamente, colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa, sendo amigos, familiares, professores, aos profissionais de serviços gerais, da secretaria, profissionais da saúde, aos companheiros de laboratório e de sala de aula que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e por todo o suporte concedido a mim.

Agradeço a cooperação dos donos das UAGs e cooperados que cederam as amostras de grãos de milho armazenados, bem como me receberam e forneceram as informações necessárias sobre as amostras e procedimentos de armazenagem. Aos profissionais da EMBRAPA RO que atenderam prontamente ao pedido de auxílio, contribuindo para a realização da pesquisa.

Aos incassáveis agricultores do nosso país, por todo o trabalho e dedicação às nossas famílias, por manterem nosso país viçoso e alimentado.

Às amigas de Rondônia, Samia Awada e Alayr Shirley Moreno, que me receberam em seus lares com tanto carinho durante o período de coleta das amostras em Porto Velho e Vilhena.

Aos meus pais por todo amor e dedicação referente à minha educação, bem-estar e formação de caráter.

À todas as palavras amigas de incentivo e boas vibrações.

RESUMO

Foram avaliadas a qualidade (danos / umidade) e a segurança (fungos / fumonisinas - FBs) de grãos de milho (*Zea mays* L.) de diferentes unidades armazenadoras de grãos (UAGs), localizado na principal região produtora de Rondônia (RO), região Norte do Brasil. Foram coletadas amostras de grãos de milho seco (total 76) armazenados em quatro UAGs (município de Vilhena) de julho a novembro de 2014 ($n \pm 4$ / mês) e avaliadas por danos (grãos quebrados, bolorados, fermentados, presença de insetos e matéria estranha, de acordo com a instrução normativa do Ministério da agricultura), umidade (teor de umidade / atividade de água - a_w), fungos (contagem total, gêneros e espécies) e FBs (FB_1 , FB_2 - FB_{total} - por cromatografia líquida de alta eficiência). As condições climáticas (dados de temperatura, umidade relativa - UR, precipitação) também foram obtidos a partir do plantio até períodos de armazenamento. Dos resultados encontrados, o maior dano dentre as amostras foi o de grãos fermentados, seguido por grãos quebrados. Grãos bolorados e gessados foram encontrados em quantidades mínimas. Em relação à umidade, o teor de umidade e a_w variaram entre 10,03 -16,10% (média de 13,20) e 0,52-0,80 (média de 0,62), respectivamente. Como esperado, esporos de fungos estavam presentes em 94,8% das amostras, dentre as quais, cinco gêneros foram isolados e 16 espécies identificadas. O gênero *Fusarium* prevaleceu, seguido por *Aspergillus* e *Penicillium*, *Cladosporium* e *Mucor*. O máximo unidades formadoras de colônias (UFC) foi de $2,2 \times 10^3$ UFC/g, em milho armazenado por período superior a 4 meses no silo, sendo de rejeito, pela qualidade ruim, da safra 2014/1. Em relação a FBs, 52,63% das amostras (40) estavam acima do limite de quantificação (FB_{total} 43,80 $\mu\text{g/kg}$) e abaixo dos limites máximos toleráveis (LMTs) do Brasil e Estados Unidos (5000/4000 $\mu\text{g/kg}$), sendo neste aspecto, seguro para o consumo. Apenas 9,20% (7) das amostras continham níveis acima do regulamento da União Européia (LMTs: 1000 $\mu\text{g/kg}$). Este é o primeiro estudo realizado quanto à presença de FBs em grãos de milho seco da região Norte do Brasil, novos estudos são necessários para segurança do consumo humano e animal. No segundo estudo, objetivou-se averiguar a segurança de milho (pipoca) e derivados, também provenientes do estado de RO. Neste, 40 amostras foram adquiridas randomicamente em supermercados, feiras públicas e agropecuárias de duas regiões do estado, sendo Porto Velho (capital e extremo norte do estado - região A) e Vilhena (extremo sul do estado - região B). Os produtos estudados

foram milho para pipoca, canjica (branca e amarela), canjiquinha, farinha de milho (flocada) e quirela (também conhecida como quirera). Os produtos selecionados com critério de produção local, safra 2014/1 (período da enchente) e 2014/2 (pós-enchente). Dentre as amostras supracitadas, os mesmos gêneros *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados com maior predominância, e em menor número, o gênero *Trichoderma* sp., dentre outros. Em relação a contagem total de colônias, o milho e derivados com finalidade para alimentação humana apresentaram índices inferiores ao LMTs brasileiro ($<1 \times 10^3$ UFC/g), sendo mínimo <10 e máx. $8,1 \times 10^2$ UFC/g. O produto com maior contaminação fúngica, em espécies e número total de colônias (mín. $9,1 \times 10^2$ e máx. $1,6 \times 10^3$ UFC/g) foi a quirela destinada ao consumo animal. Com relação à contaminação por FBs, 40% das amostras (n=16) apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação para FB₁ e FB₂ (12,5 e 31,3 µg/kg respectivamente). O milho de pipoca foi o produto que apresentou o menor índice de FBs detectável, com o teor de FB₁ 12,72 µg/kg (região A). Concluiu-se que todos os produtos apresentaram contaminação menores que os dados obtidos por outros autores, com valores muito inferiores ao permitido pela legislação brasileira, estando seguros (fungos e fumonisinas) para o consumo. Apesar da região norte apresentar condições favoráveis (clima) para o desenvolvimento fúngico, foi observado que o controle de umidade são respeitados durante a armazenagem, reduzindo assim a possibilidade de proliferação fúngica em quantidades prejudiciais à saúde humana e animal.

PALAVRAS CHAVE: Fungos toxigênicos; *Fusarium*; fumonisinas; umidade; qualidade e segurança.

ABSTRACT

Quality were evaluated (damage / humidity) and security (fungus / fumonisin - FBs) of grains of maize (*Zea mays* L.) from different storage units of grains (SUGs), located in the main producing region of Rondonia (RO) North region of Brazil. Samples of dried maize grains were collected (total 76) stored in four UAGs (municipality of Vilhena) from July to November 2014 ($n \pm 4$ / month) and evaluated for damage (broken grains, bolorados, fermented, presence of insects and foreign matter, according to the normative instruction of the Ministry of agriculture), humidity (moisture content / water activity - aw), fungi (total count, genera and species) and FBs (FB1, FB2 - FBtotal - by high performance liquid chromatography efficiency). Climatic conditions (temperature data, relative humidity - RH, precipitation) were also obtained from planting to storage periods. Of the results, the most damage among the samples was the fermented grains, followed by broken grains. bolorados and chalky grains were found in minute quantities. Relative humidity, moisture content and aw ranged from 10.03 -16.10% (average of 13.20) and 0.52 to 0.80 (mean 0.62), respectively.. As expected, fungal spores were present in 94.8% of samples, of which five were isolated genera and 16 species identified. The genus *Fusarium* prevailed, followed by *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Mucor*. The maximum colony forming units (CFU) was 2.2×10^3 CFU/g, in maize stored for longer than four months in the silo, and tailing by the bad quality of the crop 2014/1. For FBs, 52.63% of the samples (40) were above the quantitation limit (FBtotal 43.80 $\mu\text{g/kg}$) and below the maximum tolerable limits (MTLs) of Brazil and the United States (5000/4000 $\mu\text{g/kg}$). Only 9.20% (7) contained levels above the European Union regulation (MTLs: 1000 $\mu\text{g/kg}$). This is the first study for the presence of FBs in dry corn grain of northern Brazil, further studies are necessary for the safety of human and animal consumption.

For the second study aimed to investigate the corn security (popcorn) and derivatives also provenientes RO state. In this, 40 samples were purchased randomly in supermarkets, public agricultural fairs and in two regions of the state, and Porto Velho (capital and the far north of the state - A region) and Vilhena (extreme south of the state - B region). The products studied were popcorn, flaking grits (white and yellow), broken maize grains (regular grits), corn flour (flocked) and fine grits. Products selected criteria of local production, 2014/1 season (the period

of the flooding) and 2014/2 (post-flood). Among the above samples, the same *Fusarium*, followed by *Aspergillus* and *Penicillium* were isolated with a predominance, and outnumbered, the genus *Trichoderma* sp., among others. Compared to the total colony count, maize and derivatives with purpose for human consumption had lower rates to the Brazilian LMTs ($<1 \times 10^3$ CFU/g), with minimum <10 and max. $8,1 \times 10^2$ CFU/g. The product with the highest fungal contamination, species and total number of colonies (min. and max $9,1 \times 10^2$ - $1,6 \times 10^3$ CFU/g) was quirela intended for animal consumption. With regard to contamination by FBS 40% of samples ($n = 16$) showed values inferiores the limit of quantification for FB_1 and FB_2 (12.5 and 31.3 $\mu\text{g/kg}$ respectively). The popcorn was the product that showed the lowest FBs index detectable with the FB_1 content of 12.72 $\mu\text{g/kg}$ (the region A). It was concluded that all products had lower contamination that the data obtained by other authors, with much lower values than permitted by Brazilian law, being safe (fungi and fumonisin) for consumption. Despite the northern present favorable conditions (climate) for fungal growth was observed that the moisture control are respected during storage, thereby reducing the possibility of fungal proliferation in harmful quantities to human and animal health.

KEYWORDS: Fungi toxigenic, *Fusarium*, fumonisin, humidity, tropical moist, quality and safety.

LISTA DE FIGURAS

TÍTULO DA FIGURA	Pág.
CAPÍTULO I	
Figura 1 - Fluxograma do processamento de milho à seco	27
Figura 2 - Histologia do grão de milho	27
Figura 3 - Possíveis etapas de contaminação por micotoxinas em alimentos.....	32
Figura 4 - Brasil - Temperatura máxima (a) e mínima (b) no em jan/2014.....	35
Figura 5 - Brasil - separação territorial de acordo com o clima.....	36
Figura 6 - Brasil - Precipitações total (a) jan/2014 e (b) jul/2014.	39
Figura 7 - Estruturas químicas - aflatoxinas B1, B2, G1 e G2	42
Figura 8 - Estrutura química - ocratoxina A	43
Figura 9 - Estrutura química - zearalenona	45
Figura 10 - Estrutura química - patulina	46
Figura 11 - Estruturas químicas - principais fumonisinas	47
Figura 12 - Comparação de amostras de grão de milho ardidos (a) e sadios (b).....	48
CAPÍTULO II	
Figura 1 - Mapa da produção milho (<i>Zea mays</i> L.) no (a) Brasil e (b) estado de Rondônia	76
Figura 2 - Condições Climáticas do município de Vilhena, Sul do estado de Rondônia, Brasil - no período de julho à novembro de 2014.....	94
CAPÍTULO III	
Figura 1 - Milho e derivados – (a) milho para pipoca, (b) Canjica amarela, (c) canjica branca, (d) canjiquinha, (e) quirela e (f) farinha de milho.....	108
Figura 2 - Região Norte, com ênfase do estado de Rondônia (a) e estado de Rondônia, com ênfase nas áreas de coleta das amostras (b), Porto Velho (capital, extremo norte do estado) e Vilhena (extremo sul do estado).....	109
Figura 3 - Teores de FBs encontrados em quirela para consumo humano (n.25 e 26) e consumo animal (n.27-36) provenientes do estado de Rondônia, safra 2014/2	119

LISTA DE TABELAS

TÍTULO DA TABELA	Pág
 CAPÍTULO I	
Tabela 1 - Principais alimentos contaminados por micotoxinas, os fungos produtores destas e efeitos no homem e animais	40
Tabela 2 - Limites máximos Toleráveis de concentração de micotoxinas no Brasil em 2015 e 2017	50
Tabela 3 - Concentrações de fumonisinas encontradas em diferentes produtos a base de milho destinados a alimentação humana no mundo	54
 CAPÍTULO II	
Tabela 1 - Qualidade de grãos em relação a danos, impurezas e umidade do milho (<i>Zea mays</i> L.) produzidas e armazenadas no estado de Rondônia, norte do Brasil.....	83
Tabela 2 - Gêneros de fungos e espécies isoladas a partir de grãos de milho secos armazenados no estado de Rondônia, Brasil.....	86
Tabela 3 - Níveis de fumonisinas encontradas em milho seco, do sul do estado de Rondônia <i>versus</i> LMTs do Brasil, Estados Unidos da América e União Européia.....	89
 CAPÍTULO III	
Tabela 1 - Contagem total de colônias por tipo de derivado de milho provenientes do estado de Rondônia (safra 2014), região Norte do Brasil.....	114
Tabela 2 - Identificação de fungos em derivados do milho do Estado de Rondônia	116
Tabela 3 - Teores de FBs em produtos de milho provenientes de duas regiões do estado de Rondônia, Norte do Brasil, safra 2014/1 e 2014/2.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFL – Aflatoxinas

ALAR – em português significa “tão baixo quanto seja razoável”

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

CAL – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

CCA – Centro de Ciências Agrárias

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

CLAE-F – Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de Fluorescência

DNA – *Desoxirribo Nucleic Acid*, ou ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - técnica de Imunoensaio

FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FBs – Fumonisin

FDA – *Food and Drug Association* (órgão governamental dos Estados Unidos da América similar à ANVISA - BR)

g – gramas

GC-IV – cromatografia gasosa-espectroscopia infravermelho

GC-MS – cromatografia gasosa-espectrometria de massa

kg - Quilogramas

L – Litro

LABMICO – Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares

LC-MS – Cromatografia Líquida-espectrometria de Massas

LMTs – Limites Máximos Toleráveis

mL – mililitros

μL - microlitros

μg – microgramas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OTA – Ocratoxina A

OTC – Ocratoxina C

PVH – Porto Velho

Ton – toneladas

UAGs – Unidades Armazenadoras de Grãos

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UR – Umidade relativa

VLH - Vilhena

SUMÁRIO

Pág

1. INTRODUÇÃO	23
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1. Milho	25
2. Classificação.....	28
3. Fungos deteriorantes e toxigênicos.....	30
3.1 Campo.....	31
3.2 Armazenagem	33
4. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos.....	33
5. Características climáticas no brasil <i>versus</i> fungos.....	34
5.1 Temperatura	35
5.2 Umidade	37
5.3 Região Norte do Brasil	38
6. Principais micotoxinas em alimentos.....	39
7. Fumonisinhas.....	46
8. Legislação para fungos e micotoxinas.....	48
8.1 Fungos	48
8.2 Micotoxinas	49
9. Contaminação de milho e seus produtos por fungos e micotoxinas.	51
9.1 Internacional	51
9.2 Brasil	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
CAPÍTULO II - QUALIDADE E SEGURANÇA DE GRÃOS DE MILHO (<i>Zea mayz</i> L.) EM UNIDADES ARMAZENADORAS DE GRÃOS NO ESTADO DE RÔNDOIA – REGIÃO NORTE DO BRASIL	73
1. Introdução.....	74
2. Material	76
3. Métodos	78
4. Resultados e discussão	81
5. Conclusão.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO III - SEGURANÇA DE PRODUTOS DERIVADOS DO MILHO (<i>Zea mays</i> L.) DE RONDÔNIA, NORTE DO BRASIL.....	105

1. Introdução.....	106
2. Material	108
3. Métodos	110
4. Resultados e discussão	113
5. Conclusão.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
APÊNDICES.....	131
APÊNDICE I - Micobiota natural do milho após período chuvoso extremo em Rondônia, Norte do Brasil	133
APÊNDICE II - Influência do clima na classificação do milho após cheia histórica no estado de Rondônia, Norte do Brasil.....	135
ANEXOS	137
ANEXO I - Metodologia de Coleta de Amostras, Ministério da Agricultura e Pesquisa Agropecuária (MAPA).....	139
ANEXO II – novo PADRÃO DE classificação de milho, Ministério da Agricultura e Pesquisa Agropecuária (MAPA)	143
ANEXO III – Confirmação submissão Artigo I na Food Control	151

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com grande potencial para produção de alimentos, devido a sua vasta extensão territorial, climas diferenciados por região e amplas bacias hidrográficas, onde variados cultivares podem se adaptar nos diferentes climas. Todavia, esta diversidade deve ser cuidadosamente estudada, uma vez que elevadas temperaturas combinadas com alta umidade (como encontradas na região amazônica) podem favorecer o desenvolvimento de contaminantes naturais como os fungos. Estes podem se desenvolver tanto no campo, quanto durante o armazenamento de matérias primas produzidas na região para o processamento. Quando este desenvolvimento não é limitado, pode causar sérios danos à saúde do consumidor, pois podem produzir as micotoxinas.

As micotoxinas, são metabólitos secundários de fungos, os quais estão presentes no solo, na água, ou são carregados pelo vento (esporos). Quando encontram as condições (tempo, temperatura e substrato) adequadas para sua multiplicação, desenvolvem-se exponencialmente e podem gerar as micotoxinas.

Pesquisas revelam os efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos e/ou carcinogênicos das micotoxinas em humanos e animais, pela ingestão de alimentos contaminados, como os grãos de cereais (milho, trigo, cevada, arroz, aveia dentre outros), as frutas (uva, cacau, café e maçã) e sementes oleaginosas (amendoim, castanha do Brasil e nozes).

O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, estando presente na cultura brasileira, consumido de várias formas, cozido ou assado (ainda na espiga), como ingrediente principal de várias preparações culinárias (polenta, mingau, canjica, bolos, biscoitos e cuscuz), ou como coadjuvante em alimentos processados (amido e farinha). O milho também pode ser consumido na forma de bebidas (refrescos, cerveja e chás), além de estar presente na maior parte das rações animais.

Para exportação o milho de melhor qualidade é selecionado, contemplando as legislações mais rigorosas dos países importadores para limites de micotoxinas, fungos, além do teor de umidade e classificação dos grãos (pureza dos grãos, cor, índice de grãos partidos ou danificados), sendo o restante do milho destinado para a comercialização nacional ou fabricação de rações.

Estudos com milho e derivados produzidos no Brasil tem sido publicados na área de fungos e micotoxinas, porém com maior

concentração nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (onde encontra a maior produção), sendo pouca ou inexistente na região norte do país.

Embora a região norte seja conhecida pela presença da Floresta Amazônica e produção de alimentos nativos (açaí, castanha do Brasil, cupuaçu dentre outros), que além de sua produção local, os estados que compõem a Amazônia ocidental (Amazonas, Acre, Rondônia - RO - e Roraima), possuem também produção de outras culturas incluindo os cereais (principalmente de milho). Embora seja região conhecida por seu clima quente e úmido (propício para desenvolvimento de fungos e inclusive dos toxigênicos), poucos são os trabalhos publicados no assunto.

Considerando que no estado de RO, objetivo do presente trabalho, a produção de milho é a terceira de maior valor para sua economia, na safra 2012/2013, a produção foi superior a 700 toneladas com retorno de R\$ 289.8 milhões. O plantio é realizado em vários municípios do estado, especialmente na região do cone sul devido maior índice de mecanização (plantio / colheita/aramazenagem). O produto é comercializado no mercado interno e exportado principalmente para Venezuela e Argentina, na América do Sul.

Este trabalho será um dos pioneiros a utilizar matéria prima do estado de Rondônia, sendo relevante tanto para os produtores, quanto para as indústrias, os consumidores e para os pesquisadores brasileiros, visando um novo campo de pesquisa, uma vez que a região norte é grande produtora de alimentos.

CAPÍTULO I - REVISÃO LITERÁRIA

1. MILHO (*Zea mays* L.)

O milho é considerado uma das mais importantes e antigas culturas agrícolas. Tem origem nas Américas, mas é cultivado desde a Rússia até a Argentina, em diferentes latitudes. Representa um produto estratégico para a segurança alimentar da população mundial sendo utilizado para a nutrição humana e alimentação animal, principalmente na avicultura, suinocultura e bovinocultura de corte e de leite (BRASIL, 2011).

A temperatura ideal para seu desenvolvimento (de à emergência à floração) é de 24 a 30°C, no entanto, o milho obtém maior produção de matéria seca e maior rendimento de grãos à temperatura mais baixa (21°C). A queda do rendimento sob temperaturas elevadas se deve ao curto período de tempo de enchimento de grãos, em virtude da diminuição do ciclo da planta. O alto teor energético (carboidrato, lipídeos e proteínas) faz do milho importante produto comercial (EMBRAPA, 2010).

No Brasil o cultivo do milho está mais concentrado nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. No entanto, a região norte do país, tem crescente interesse neste cereal, para implementação da economia da região com objetivo de exportação.

O estado de Rondônia (RO), localizado na região Norte do país, produziu cerca de 651 toneladas de milho em 2014 (BRASIL, 2015) e contou com o apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), para aprimoramento de sementes (principalmente cultivares de milho híbrido) com melhor adaptação às condições climáticas equatoriais (quente e úmido) e áreas de elevada altitude (temperaturas mais amenas).

O milho é a principal cultura em área plantada em RO com níveis de produção desde plantios de *subsistência* (agricultura familiar - regiões Centro e Norte), até sistemas de alta mecanização (em sucessão à soja - concentrados no cone sul do estado) (EMBRAPA, 2008). Nesta região sul do estado, verificamos uma estrutura de armazenamento bem desenvolvida (Unidades Armazenadoras de Grãos – UAGs), mas de comercialização ainda precária e dependente da exportação, uma vez que a demanda do milho no Estado ainda é pequena.

O milho é consumido tanto diretamente, na propriedade (manutenção da família e animais domésticos), quanto na produção de

produtos cárneos (alimentação de aves/suínos/bovinos, fábricas de ração existentes no estado), aquisição pelo governo federal (CONAB), e exportação para outros estados e países.

A transformação do milho em diversos derivados (Figura 1) possibilita o uso desse cereal como excelente fonte de matéria-prima para a indústria de alimentos. Do milho, obtêm-se em torno de noventa derivados diferentes; entre esses, os principais são *grits*, fubá, canjica, óleo, amido, amilose, amilopectina, zeína e fibras (GONÇALVEZ *et al*, 2003).

Morfológicamente o milho é composto basicamente por três partes, pericarpo (5%), endosperma (82%) e germe (13%), conforme Figura 2. As principais proteínas presentes no milho são representadas pelas zeínas (endosperma) e a gluteína (germe), ambas, entretanto, são consideradas proteínas incompletas ou de baixo valor nutricional, em função de apresentarem baixos teores em aminoácidos essenciais. A zeína, contida no endosperma do grão, tem reduzido valor biológico, devido ao desequilíbrio causado pelo alto teor de leucina e pela deficiência de lisina e de triptofano (REGINA e SOLFERINI, 2002). Nutricionalmente, a gluteína por ser mais solúvel é mais digestível do que a zeína (FIALHO, 2005; TURCI e SOARES, 2014).

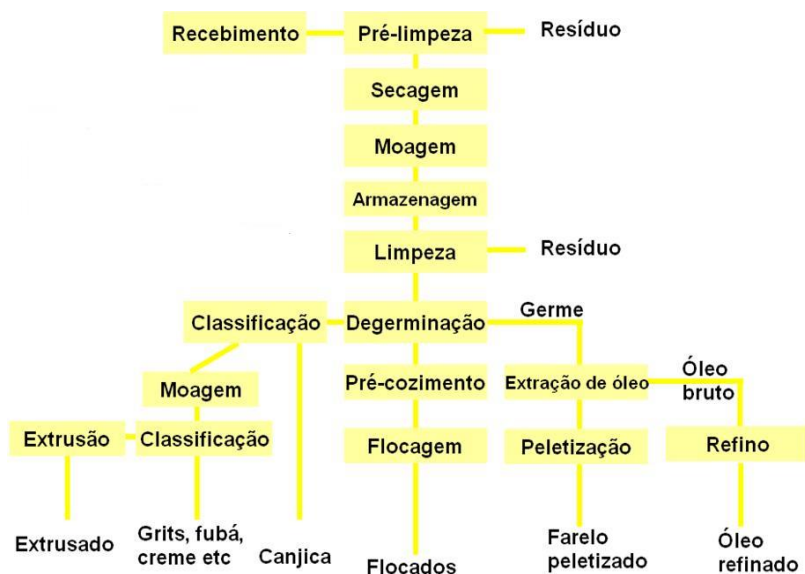


Figura 1. Fluxograma do processamento de milho à seco (ABIMILHO, 2008).

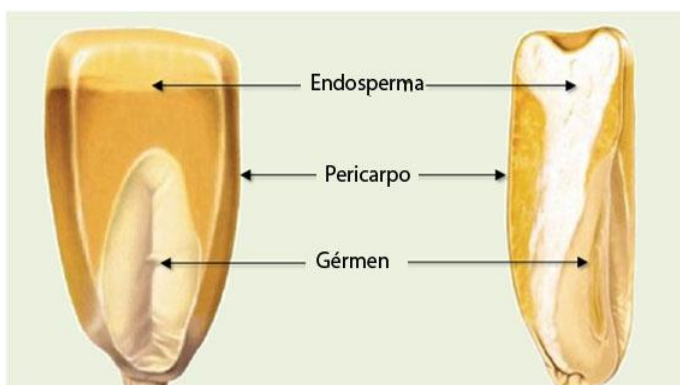


Figura 2. Estrutura do grão de milho (AMARAL & BERNARDES, 2012).

O endosperma do grão de milho é composto por 86% de amido e 19% de proteína. O grão de amido do milho apresenta dois tipos de moléculas: a amilose e a amilopectina, na proporção de 27 e 73% respectivamente, conferindo a esse ingrediente um alto valor energético, pois seu alto conteúdo de amido encontra-se na forma facilmente digerível (BUTOLO, 2002). As proteínas do endosperma do milho podem ser separadas em quatro frações maiores: albuminas, globulinas, zeínas e glutelinas, que constituem aproximadamente 3, 3, 60 e 34% respectivamente do total de proteínas do endosperma (FIALHO, 2005; TURCY e SOARES, 2011).

O milho é considerado o mais importante componente energético das rações. Se corretamente processado pelo calor, a digestibilidade de seus nutrientes é melhorada, principalmente a da energia (MOREIRA *et al.*, 1994; FREITAS *et al.*, 2005). O tratamento térmico aumenta a digestibilidade dos carboidratos porque a amilose e a amilopectina, organizadas inicialmente em grânulos, são expostas a uma maior ação enzimática quando os grânulos são desfeitos pelo calor. Processos que utilizam temperatura e pressão com potencial para a gelatinização do amido aumentam a digestibilidade que resulta em maiores valores de energia metabolizável. Também, melhoram a digestibilidade dos lipídios presentes nos grãos, pelo rompimento das estruturas celulares que os protegem (LEESON e SUMMERS, 1997; FREITAS *et al.*, 2005).

2. CLASSIFICAÇÃO DO MILHO

Na maioria dos países, os padrões de qualidade (cor, grãos quebrados, índice de rachados, material estranho, grãos danificados), teor de água, peso hectolítrico, presença de fungos e presença de micotoxinas são verificados, esses parâmetros definem a qualidade dos grãos para transações comerciais (ASCHERI e GERMANI, 2004; BENTO, 2011).

No Brasil, os defeitos do milho são verificados de acordo com a normatização do Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011). Para os procedimentos operacionais para classificação do milho, deve ser observado previamente que a amostra final do milho seja no mínimo de 1kg, a qual deve ser homogeneizada e reduzida pelo processo de quarteamento, até a obtenção da amostra de trabalho, de no mínimo 250 g (duzentos e cinquenta gramas), pesada em balança previamente aferida, anotando-se o peso obtido para efeito de cálculo dos percentuais de tolerâncias previstos na Instrução Normativa.

Algumas definições de defeitos se fazem necessárias para maior compreensão do procedimento, sendo, ***grãos ardidos*** - são grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento total, por ação do calor, umidade ou fermentação avançada atingindo a totalidade da massa do grão, sendo também considerados como ardidos, devido à semelhança de aspecto, os grãos totalmente queimados; ***grãos chochos ou imaturos*** - são grãos desprovidos de massa interna, enrijecidos e que se apresentam enrugados por desenvolvimento fisiológico incompleto, sendo que os grãos pequenos e os de endosperma córneo (ponta de espiga) não serão considerados chochos ou imaturos, sendo considerados grãos normais; ***grãos fermentados*** - são grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento parcial do germe ou do endosperma provocado por processo fermentativo ou calor, sendo também considerados como fermentados, devido à semelhança de aspecto, os grãos que se apresentam parcialmente queimados; grãos que apresentam plúmula roxa, como característica varietal, não são considerados grãos defeituosos; ***grãos germinados*** - são grãos ou pedaços de grãos que apresentam início visível de germinação; ***grãos gessados*** - são grãos ou pedaços de grãos que tenham sofrido variação na sua cor natural, apresentando-se de esbranquiçado ao opaco, mostrando no seu interior todo o endosperma amiláceo com cor e aspecto de gesso (farináceo); e por fim, ***grãos mofados*** - grãos ou pedaços de grãos que apresentam contaminações fúngicas (mofo ou

bolor) visíveis a olho nu, independentemente do tamanho da área atingida, bem como os grãos ou pedaços de grãos que apresentam coloração esverdeada ou azulada no germe, produzida pela presença de fungos.

Duas peneiras são utilizadas na separação dos grãos quebrados, das matérias estranhas e impurezas, utilizando de maneira superposta as peneiras de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro e de crivos circulares de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro, executando movimentos contínuos e uniformes durante 30 (trinta) segundos. As matérias estranhas e impurezas que ficarem retidas nas peneiras de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro e de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro serão catadas manualmente e adicionadas às que vazarem na peneira de crivos circulares de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro e pesadas, determinando seu percentual e anotando o valor encontrado no Laudo de Classificação. Os pedaços de grãos sadios que ficarem retidos na peneira de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro não serão considerados quebrados ou matérias estranhas e impurezas, sendo considerados grãos normais. No entanto, os pedaços de grãos que vazarem na peneira de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro e ficarem retidos na peneira de crivos circulares de 3,00 mm (três milímetros) serão considerados quebrados, pesando e anotando o valor encontrado no Laudo de Classificação. Por fim aferir o peso da amostra que ficou retida na peneira de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro, anotando o valor encontrado no Laudo de Classificação e iniciar a separação por defeito (citados a cima – mofados, gessados, chochos, ardidos etc), ao final pesar cada um e realizar o cálculo do percentual. Após anotações de cada etapa no laudo, verificar o enquadramento do produto em Tipo, considerando os percentuais encontrados, conforme a distribuição dos defeitos e respectivas tolerâncias, explicitadas na normativa (BRASIL, 2011).

Para a determinação da classe do milho, recompor a amostra de trabalho utilizada para a determinação do grupo e aferir o peso da amostra, anotando o resultado obtido no Laudo de Classificação, sendo que esse valor será utilizado posteriormente para o cálculo do percentual de grãos de cada classe.

3. FUNGOS DETERIORANTES TOXIGÊNICO

Os fungos ou bolores são organismos multinucleados que aparecem como filamento. O corpo ou talo de um fungo filamentoso consiste em um micélio e nos esporos. Cada micélio é uma massa de filamentos chamada hifa. Cada hifa é formada pela reunião de muitas células. As paredes rígidas das hifas são formadas de quitina, celulose e glicose (TANIWAK, 2001).

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os grãos estão sujeitos à invasão por fungos e à contaminação com micotoxinas no campo, durante a colheita, processamento, transporte e armazenagem, quando em condições deficientes de manuseio (SCUSSEL, 2002; RUPOLLO *et al.*, 2004; BEBER-RODRIGUES e SCUSSEL, 2013).

Sob condições ambientais favoráveis, fungos toxigênicos tais como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium spp* podem produzir micotoxinas em produtos agrícolas durante o crescimento da planta, ou após a colheita em armazenagem e expedição, conforme a Figura 3. Estes compostos podem estar presentes, mesmo após a remoção do micélio e uma vez que a maior parte deles são resistentes a tratamentos físicos e químicos; eles costumam ficar no alimento durante o processamento e armazenamento (SCOTT, 1991; FALASCONI *et al.*, 2005).

Atualmente estudos apontam a existência de mais de 80 espécies fúngicas micotoxígenas, que podem produzir mais de 300 diferentes tipos de micotoxinas, sendo que algumas espécies são capazes de produzir mais de um tipo de micotoxinas, podendo ser encontradas simultaneamente em um único produto. Os principais fungos produtores pertencem aos gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Stachybotrys*, dentre eles destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que são considerados os de maior importância para alimentos e ração, por serem os mais encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (GIMENO, 2000; HUSSEIN e BRASEL, 2001; SASSAHARA *et al.*, 2003; YANAKA *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2006; SANTOS, 2006; SIMAS *et al.*, 2007; KELLER *et al.*, 2007; CALVET, 2008; NUNES, 2009; CARDOSO e MURATORI, 2011).

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são freqüentemente divididos em dois grupos: fungos do campo, que infectam o produto ainda no campo e fungos de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem (MÁRCIA e LÁZZARI, 1998).

3.1 Campo

Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90-100% para crescerem (MÁRCIA e LÁZZARI, 1998).

Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (MILLER, 1995; SINHA e SINHA, 1991; MÁRCIA e LÁZZARI, 1998).

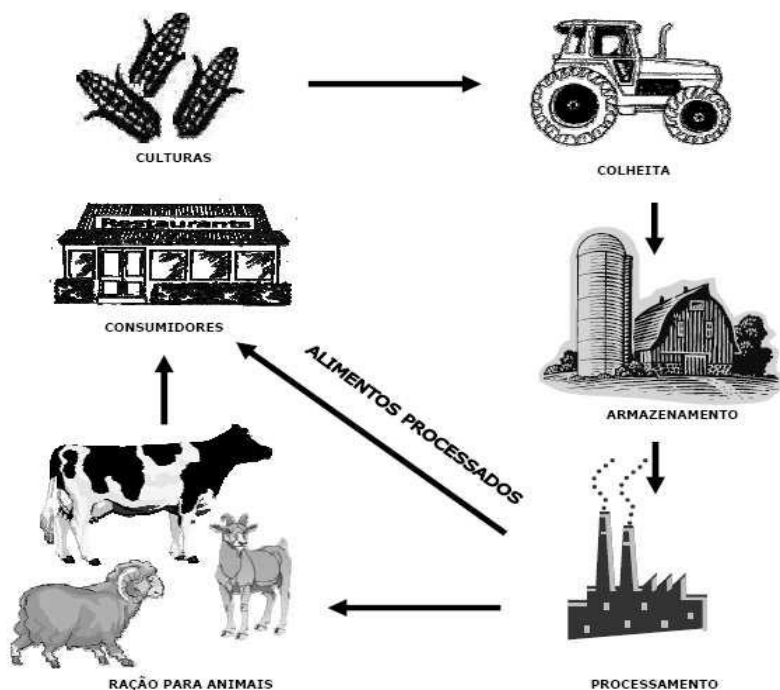


Figura 3. Possíveis etapas de contaminação por micotoxinas em alimentos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Bottalico e colaboradores (1995) encontraram *Fusarium* como o fungo mais importante em milho armazenado e seus derivados, principalmente a espécie *F. moniliforme*, vários autores relatam ter encontrado o mesmo gênero entre as amostras de grãos de milho e seus derivados (BULLERMAN e TSAI, 1994; NORRED, 1992; PEREIRA, 1994), este aspecto é relevante, uma vez que *Fusarium* é um gênero fúngico com potencial desenvolvimento ainda no campo. Márcia e Lazzari (1998), encontraram cerca de 97,5% de amostras de milho em grão, 13,6% de amostras de grãos e 79% de amostras de fubá infectadas por *Fusarium*, sendo a espécie predominante *F. moniliforme*.

3.2 Armazenagem

Os fungos de armazenagem são os que podem crescer com atividade de água reduzida, cerca de 70 – 90% do teor de umidade em

alimentos armazenados (SILLIKER *et al*, 1985). São representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*, encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto.

Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. Candi-dus*, *A. alutaceus*, *A. ochraceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (MILLER, 1995; SINHA e SINHA, 1991).

4. FATORES QUE FAVORECEM O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho incluem: teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física e sanitária do grão, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos (HAGSTRUM e FLINN, 1992; MILLER, 1995; SINHA e SINHA, 1991; MÁRCIA e LÁZZARI, 1998).

O processo de limpeza e secagem dos grãos antes do armazenamento é prática agrícola recomendada para assegurar a qualidade do produto durante o armazenamento. O grão armazenado deve ser monitorado quanto a presença dos contaminantes (insetos e fungos), já que é um substrato importante para o ataque de fungos e de micotoxinas (DALPASQUALE, 2002; WEBER, 2001, 2005).

5. CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DO BRASIL *VERSUS* FUNGOS

O clima pode ser definido como uma generalização ou uma integração das condições do tempo para certo período, em determinada área. O clima de uma região é condicionado por fatores como precipitação, umidade relativa, radiação solar, temperatura do ar, velocidade do vento, direção do vento e pressão atmosférica. Esses fatores, por sua vez, são influenciados por altitude, latitude, topografia, características do solo e da vegetação, entre outros aspectos (VIANELLO, 1991; VAREJÃO, 2005; ALVARENGA, 2012).

Parte da radiação solar dirigida a terra é absorvida pela superfície terrestre (70%); a outra parte (30%) é refletida na forma de calor (RODRIGUES, 1994). Desta, uma parcela se dissipa e retorna ao espaço enquanto outra parcela é impedida de retornar pela barreira de gases que funcionam como uma estufa, absorvendo a radiação infravermelha e propiciando o aquecimento da terra. A ocorrência natural desse processo mantém constante a temperatura em torno de 15°C. Sem a ocorrência natural do efeito estufa, a temperatura média planeta seria em torno de -18°C (SIMON, 1992).

Considerando a extensão do território brasileiro que se estende desde aproximados 32° de latitude Sul até 5° de latitude norte, é natural encontrarmos uma diversidade de tipos climáticos que variam desde climas quentes e secos/úmidos a climas frios e úmidos. Também se faz necessário considerar a variação altimétrica que varia de próximo de 0 metro em grande extensão da planície litorânea a 3.014 metros no pico da neblina (AM). Não bastasse a variação latitudinal (norte a sul) e altimétrica alia-se a esta diversidade de fatores que influenciam os climas do Brasil o efeito da maritimidade/continentalidade pela presença de extensa massa de águas a leste do continente - Oceano Atlântico (GALVANI, ____).

Freire e colaboradores (2007) afirmam que o nosso país possui condições ambientais excelentes para o crescimento de todos esses fungos micotoxigênicos, os quais possuem efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal (ração), sendo capazes de induzir efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. Os países que importadores de alimentos têm se preocupado cada vez mais quanto à presença de micotoxinas nos alimentos. O que tem levado à elaboração de legislações mais rígidas, logo, o Brasil possivelmente enfrentará dificuldades para exportar seus produtos agrícolas.

Espera-se que o conhecimento das condições que governam a produção de toxinas possa contribuir na prevenção das mesmas nos alimentos.

Dentre os fatores envolvidos na produção de micotoxinas existem os relacionados a própria fisiologia e bioquímica dos fungos toxigênicos e fatores extrínsecos (ambientais), tais como a umidade, a composição química dos alimentos (substrato), a temperatura, o ph, a interação microbiana, entre outros (IAMANAKA, OLIVEIRA E TANIWAKI, 2010).

5.1 Temperatura

A exemplo a amplitude térmica média no mês de julho (Figura 4) em Salvador (BA) é de 4,8°C e em Cuiabá (MT) é de 15,2°C (INMET, 1992).

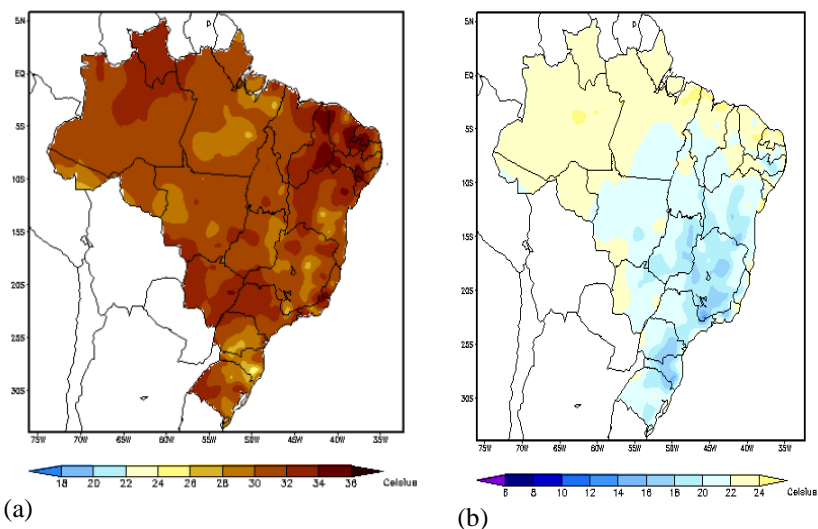


Figura 4. Brasil - Temperatura máxima (a) e mínima (b) no em Jan/2014 (BRASIL, 2015).

Vale lembrar que ambas as localidades estão em latitudes próximas. Aliado a esses fatores encontra-se uma dinâmica de circulação atmosférica onde as massas de ar transportam as características das regiões de origem para outras regiões, a exemplo da

massa polar atlântica (mPa) que, predominante, nos meses do inverno avançam pelo centro-sul do Brasil promovendo reduções significativas da temperatura do ar (GALVANI, ____).

A localização de cerca de 92% do território brasileiro na zona intertropical e as baixas altitudes do relevo explicam a predominância de climas quentes, com médias de temperatura superiores a 20° C. Os tipos de clima presentes no Brasil são: equatorial, tropical, tropical de altitude, tropical atlântico, semi-árido e subtropical (Figura 5).



Figura 5. Brasil - separação territorial de acordo com o clima (GALVANI, ____).

O clima equatorial domina a região amazônica e se caracteriza por temperaturas médias entre 24° C e 26° C e amplitude térmica anual (diferença entre a máxima e a mínima registrada durante um ano) de até 3° C. As chuvas são abundantes (mais de 2.500 mm/ano) e regulares, causadas pela ação da massa equatorial continental. No inverno, a região pode receber frentes frias originárias da massa polar atlântica.

Elas são as responsáveis pelo fenômeno da friagem (queda brusca na temperatura), que pode chegar a 10° C. Extensas áreas do

planalto central e das regiões Nordeste e Sudeste são dominadas pelo clima tropical. Nelas, o verão é quente e úmido e o inverno, frio e seco. As temperaturas médias excedem os 20° C, com amplitude térmica anual de até 7° C. As chuvas variam de 1.000 a 1.500 mm/ano (GALVANI, ____).

O tropical de altitude predomina nas partes altas do Planalto Atlântico do Sudeste, estendendo-se pelo norte do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul. Apresenta temperaturas médias entre 18°C e 22°C e amplitude térmica anual entre 7° C e 9° C. O comportamento pluviométrico é igual ao do clima tropical. As chuvas de verão são mais intensas devido à ação da massa tropical atlântica. No inverno, as frentes frias originárias da massa polar atlântica podem provocar geadas (GALVANI, ____).

O clima semi-árido predomina nas depressões entre planaltos do sertão nordestino e no trecho baiano do vale do Rio São Francisco. Suas características são temperaturas médias elevadas, em torno de 27° C, e amplitude térmica em torno de 5° C. As chuvas, além de irregulares, não excedem os 800 mm/ano, o que leva às “secas do Nordeste”, os longos períodos de estiagem. O clima subtropical predomina ao sul do Trópico de Capricórnio, compreendendo parte de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul e os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Caracteriza-se por temperaturas médias inferiores a 18° C [Figura 6 (b)], com amplitude térmica entre 9° C e 13° C. Nas áreas mais elevadas, o verão é suave e o inverno frio, com nevascas ocasionais. Chove entre 1.500 mm e 2.000 mm/ano, de forma bem distribuída ao longo das estações (GALVANI, ____).

5.2 Umidade

Um dos elementos climáticos mais importantes é a precipitação, pois ela afeta diretamente o ciclo da água e outros elementos climáticos. A precipitação muitas vezes causa alagamentos e deslizamentos de terra (ALVARENGA, 2012).

Os cereais colhidos com alto teor de umidade, tal como o arroz e o milho, podem ser classificados como apresentando potencial risco de crescimento de fungos na armazenagem. Da mesma forma, em regiões onde a umidade é alta e as secagens no campo são deficientes os riscos de contaminação por fungos se tornam bastante significativos. É importante salientar que muitas espécies de *Aspergillus* se desenvolvem

lentamente em locais com conteúdo de umidade abaixo de 18% (JOBIM, GONÇALVES e SANTOS, 2001).

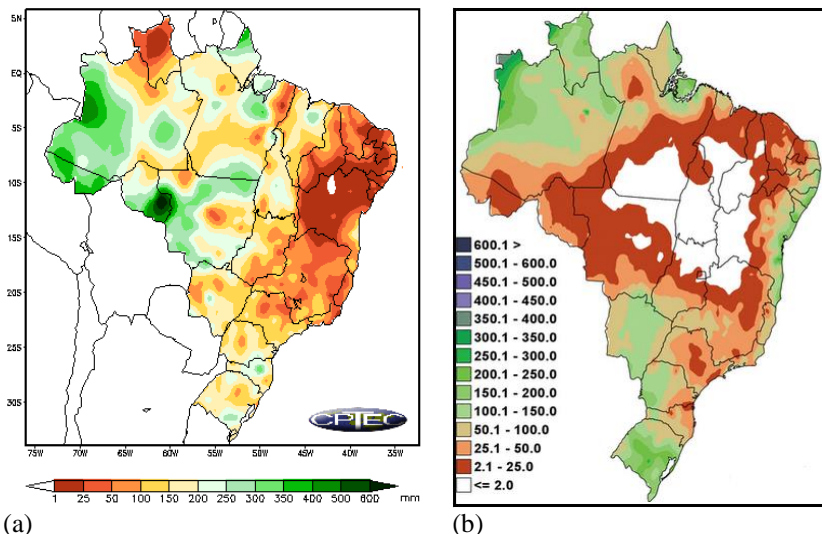
5.3 Região Norte do Brasil

A área da Amazônia Legal no Brasil é de 5032925 km², compreendidos pelos estados do Pará, Amazonas, RO, Roraima, Acre e Amapá e parte dos estados do Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (BRASIL, 1998), sendo que a Amazônia Ocidental abrange somente os estados do Acre, Amazonas, RO e Roraima (BRASIL, 1967).

A Amazônia situa-se na região equatorial e possui um clima quente e úmido, embora este comportamento não tenha sido uma constância durante os últimos 15.000 anos. O clima atual da região Amazônica é uma combinação de vários fatores, sendo que o mais importante é a disponibilidade de energia solar, através do balanço de energia (FISCH *et al*, 1998).

O período de chuvas ou forte atividade convectiva na região Amazônica é compreendido entre novembro e março [Figura 6 (a)], sendo que o período de seca (sem grande atividade convectiva) é entre os meses de maio e setembro [Figura 6 (b)]. Os meses de abril e outubro são meses de transição entre um regime e outro. A distribuição de chuva no trimestre dezembro-janeiro-fevereiro (DJF) apresenta uma região de precipitação alta (superior a 900 mm) situada na parte oeste e central da Amazônia, em conexão com a posição geográfica da Alta da Bolívia (BRASIL, 1998).

Embora a literatura afirme que a temperatura média seja de 25,8 °C em Porto Velho, capital de RO a 27,6 °C em Manaus, capital do Amazonas (EMBRAPA,____) as temperaturas costumam ser amenas no período chuvoso, no entanto, nos meses de junho e julho, período de estiagem em RO a média de temperatura é mais elevada (30 à 32°C), conforme os registros meteorológicos do Instituto Nacional de Pesquisa Espacial (INPE), podendo atingir 40°C durante o período de maior incidência solar [Figura 6 (b)].



(a) (b)
 Figura 6. Brasil - Precipitações total (a) jan/2014 e (b) jul/2014 (BRASIL, 2015).

6. PRINCIPAIS MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

Micotoxinas são metabólitos secundários que frequentemente contaminam produtos agrícolas, no campo, ou durante a colheita, transporte e estocagem. São produzidas por fungos, com estruturas químicas diversas, incluindo muitas espécies do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (AYRES, 1979 apud ONO, 2004). Sua entrada no organismo comumente se dá pela via digestiva e sua absorção geralmente causa reações sob a forma de hemorragias, ou mesmo, necroses. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (SANTURIO, 2000, apud MAZIERO e BERSOT, 2010).

As micotoxinas podem ser encontradas em vários alimentos (Tabela 1), contudo, alguns são mais favoráveis que outros e em geral, naqueles que contém maior teor de carboidratos. No entanto, as espécies de *Aspergillus section Flavi*, têm mostrado maior preferência às oleaginosas como amendoim, castanhas do Brasil, pistácias e amêndoas (OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010). Cereais contaminados podem representar uma direta fonte de exposição humana, pelo seu consumo direto, ou uma fonte indireta através do consumo de produtos derivados

de animais alimentados com contaminada alimentar (DUARTE *et al*, 2010; BEBER-RODRIGUES e SCUSSEL, 2013).

Alguns gêneros de fungos são responsáveis pela produção de toxinas, as micotoxinas, entre as quais, destacam-se: a aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona, patulina, fumonisina, tricoteceno e citrinina.

Tabela 1 - Principais alimentos contaminados por micotoxinas, os fungos produtores destas e efeitos no homem e animais

Principais substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Efeitos
Amendoim	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B1	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrina	Nefrotóxica para suínos
Centeio e grãos em geral	<i>Claviceps purpúrea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidades ou convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonatus</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, neurotóxica e carcinogênica
Frutas e suco de frutas	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Toxidade vagamente esclarecida
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	<i>Fusarium sp</i> ; <i>Myrothecium sp</i> ; <i>Stachybotrys sp</i> e <i>Trichotecium sp</i> .	Tricotecenos: T2, neosolaniol, Fusanona x, niva-lenol, deoxivalenol	Hemorragias, vômito e dermatites
Cereais	<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Baixa toxidade, síndrome de masculinização e feminilização em suínos

(FIB, 2009).

6.1 Aflatoxinas (AFLA)

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes, produzidas sobretudo por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. É o grupo de micotoxinas com o maior impacto no desenvolvimento de pesquisas na área de micotoxicologia, devido à sua implicação, na década de 60, na morte (doença X) de mais de 100.000 aves alimentadas com ração contaminada na Inglaterra (COLE e COX, 1981; KAWASHIMA, 2004).

A estrutura química do grupo das aflatoxinas é caracterizada pela ligação de dihidrofurano ou tetrahidrofurano a uma estrutura cumarínica (Figura 7).

O termo micotoxina foi criado em 1962, quando ocorreu a famosa mortalidade de perus jovens, na Inglaterra, após a ingestão de torta de amendoim proveniente do Brasil e da África (BLOUT, 1961 e FORGACS, 1962 apud FREIRE *et al.*, 2007), sendo que a confirmação de que um metabólito secundário produzido por *A. flavus* era o responsável pelas mortes das aves, promoveu uma verdadeira corrida para o estudo dessas toxinas. Assim o termo aflatoxina foi formado a partir do nome do seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus* toxina). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de B1, B2, G1 e G2, com base na fluorescência delas sob luz ultravioleta (B=Blue, G=Green) e na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (FREIRE *et al.*, 2007).

A aflatoxina B1 é considerada atualmente como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico dentre as micotoxinas (IARC, 1997), além de ser também a mais freqüentemente encontrada em alimentos. A sua toxicidade aguda para o fígado, hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade são alguns dos efeitos nocivos da exposição as aflatoxinas (KAWASHIMA, 2004).

Os efeitos da intoxicação aguda por aflatoxinas caracterizam-se por danos hepáticos, tais como ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática causados em várias espécies animais (BUTLER, 1974 e CULLEN e NEWBERNE, 1994 apud KAWASHIMA, 2004). Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais (DOLL e PETO, 1981; CALDAS *et al.*, 2002; KAWASHIMA, 2004).

Em virtude da capacidade de se ligarem ao DNA das células, as aflatoxinas afetam a síntese protéica, além de contribuírem para a ocorrência da aplasia tímica - ausência congênita do timo e das paratireóides, com conseqüente deficiência da imunidade celular; também conhecida como síndrome de Di George - (RAISUDDIN, 1993 apud FREIRE *et al*, 2007) e que as aflatoxinas têm propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções em pessoas contaminadas com essas substâncias.

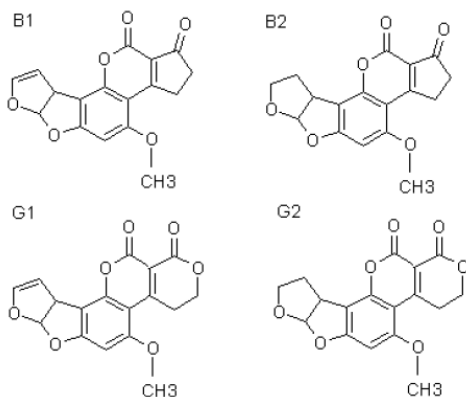


Figura 7. Estruturas químicas das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (KAWASHIMA, 2004).

No Brasil, as aflatoxinas têm sido encontradas em amendoim e seus derivados (SANTOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al*, 1997; CALDAS *et al.*, 2002), em alimentos destinados a bovinos e em leite líquido (TAVEIRA e MIDIO, 1999; PEREIRA *et al.*, 2005), em amêndoas de castanha-do-brasil e de cajueiro (CASTRILLON e PURCHIO, 1988; FREIRE *et al.*, 1999; 2000). Perus, frangos e suínos alimentados com rações contaminadas com aflatoxinas apresentam uma nítida redução de imunidade, ocasionando sérios problemas econômicos aos produtores (SMITH *et al.*, 1995; FREIRE *et al*, 2007).

6.2 Ocratoxina A (OTA)

A ocratoxina A é o composto mais tóxico do grupo das 7 ocratoxinas existentes (BUSBY JR e WOGAN, 1981; OMS, 1983). É principalmente produzida pelo *Aspergillus alutaceus* (*Aspergillus ochraceus*) (KOZAKIEWICZ, 1989, citado por MARQUARDT e FROHLISH, 1992), embora também a produzam *Aspergillus melleus*,

Aspergillus sulphureus, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium commune*, *Penicillium purpurecens*, *Penicillium palitans*, *Penicillium verrucosum*, entre outros (MOSS, 1996). A ocratoxina A é predominantemente produzida pelo *Penicillium viridicatum* em climas frios e *Aspergillus alutaceus* em climas quentes (STEYN, 1984). Quimicamente, as ocratoxinas (Figura 8) são derivadas da dihidrometil-isocumarina ligada a L-fenilalanina (KAWASHIMA, 2004).

A ocratoxina A tem sido relatada em até 50% das amostras de milho, trigo, arroz e feijão analisadas em vários estados do Brasil (AMRIM et al, 2000; CORREA et al, 2000; SOARES e RODRIGUEZ, 1989; CALDAS, et al, 2002).

Ocratoxina A

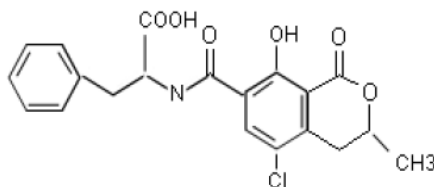


Figura 8. Estrutura química da ocratoxina A (KAWASHIMA, 2004).

É uma micotoxina dita de armazenamento produzida por espécies de apenas dois gêneros dos fungos *Penicillium* e *Aspergillus* (GONZÁLEZ-PEÑAS et al., 2006 apud FERNANDES, 2007). Duas espécies de *Penicillium* (*P. verrucosum* e *P. nordicum*), são agora aceitas como produtoras de OTA. Alguns membros do grupo *Aspergillus*; *A. niger*, *A. carbonarius* e *A. terreus isolates* são também relatados como produtores de OTA.

Como a maioria das micotoxinas, a OTA é termicamente estável, e sendo testada, a maior taxa de destruição alcançada pelo cozimento de sementes de fava, foi de 20% e que os pesquisadores concluíram que a OTA não pode ser destruída por procedimentos normais de cocção (FOOD INGREDIENTS BRAZIL, 2009).

A OTA é essencialmente um contaminante em cereais (milho, cevada, trigo e aveia) e leguminosas, também foi encontrada em café, vinho, cerveja, sumo de uvas, cacau, frutas secas, especiarias, bem como em tecidos animais edíveis, sangue humano e no leite (FERNANDES, 2007).

Estudos vem demonstrando que OTA é nefrotóxica em todas as espécies animais mamíferas (laboratoriais) estudadas até o momento e

muito provavelmente para os humanos, pois estes apresentam tempo de vida mais longo para a eliminação desta toxina. O principal órgão afetado é o túbulo renal próxima, exercendo efeitos citotóxicos e carcinogênicos (DELAGE *et al.*, 2003).

Para além de outros efeitos tóxicos para a saúde, a OTA mostrou ser teratogênica, imunotóxica (propriedades imunossupressivas), genotóxica, mutagênica, hepatotóxica e carcinogênica, todos eles conduzindo a patologias perigosas e fatais (NGUNDI *et al.*, 2005; SOUFLEROS *et al.*, 2003 apud FERNANDES, 2007).

A ocratoxina também é suspeita de ser a causa parcial do câncer do trato urinário e danos ao rim que ocorre no leste europeu. A ocratoxina A foi reclassificada pelo IARC (1993) como um possível carcinógeno para humanos (classe 2B) (IAMANAKA, OLIVEIRA E TANIWAKI, 2010).

Até recentemente a produção de ocratoxina A estava restrita à *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas pertencentes à *Aspergillus* section *Circumdati* e à espécie *Penicillium verrucosum*. Recentemente, o número de trabalhos sobre a produção de ocratoxina A pelos membros de *Aspergillus* section *Nigri* tem aumentado, desde a sua primeira publicação em 1994 por Abarca *et al.* (1994). Estas espécies são muito comuns em alimentos de várias partes do mundo, mas principalmente em regiões com temperaturas mais quentes.

A exposição humana decorre da ingestão de uma variedade de alimentos, sendo os cereais e derivados as fontes representativas de OTA na dieta, 40-50% de ingestão total (FUJII, GARCIA e HIROOKA, 2004).

6.3 Zearalenona

Zearalenona é definida como metabólito secundário produzido, principalmente, por *Fusarium graminearum*. Outras espécies, tais como *Fusarium culmorum*, *Fusarium equisetii* e *Fusarium crookwellense* também produzem essa substância e outras análogas. Essas espécies fúngicas são amplamente encontradas como contaminantes em muitos países (HAGLER *et al.*, 2001 apud FREIRE *et al.* 2007).

A denominação de toxina para a zearalenona é considerada inadequada uma vez que, embora biologicamente potente, ela é raramente tóxica. Sua estrutura, na realidade, assemelha-se ao 7 β -estradiol, principal hormônio produzido no ovário feminino humano.

Zearalenona seria mais bem classificada como estrógeno não esteroidal ou um micoestrógeno (BENNETT e KLICH, 2003).

A zearalenona é descrita quimicamente (Figura 9) como uma lactona do ácido fenólico resorcílico (KAWHASHIMA, 2004).

A zearalenona tem sido implicada em vários incidentes nas mudanças da puberdade em crianças (KUIPER-GOODMAN *et al.*, 1987, apud IAMANAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010).

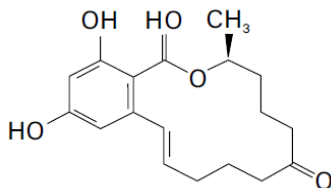


Figura 9. Estrutura química da zearalenona (FREIRE *et al.*, 2007).

Associados ao milho, esses organismos invadem a planta no estágio de floração, especialmente no período chuvoso ou se os níveis de umidade permanecerem altos após a colheita, o fungo cresce e produz a toxina. Além do milho, outros grãos podem ser contaminados, como o trigo, aveia, cevada e gergelim. Informa que a zearalenona fluoresce azul esverdeada sob luz UV de comprimento curto (____, 2009; KAWASHIMA, 2004).

6.4 Patulina

Em torno de 1940, a patulina foi isolada primeiramente como antimicrobiana a partir do fungo *Penicillium patulum*, posteriormente denominado de *Penicillium urticae* e, atualmente, de *Penicillium griseofulvum* (CIEGLER *et al.*, 1971; CIEGLER, 1977). Posteriormente foi isolada a partir de outras espécies fúngicas e recebeu diferentes denominações, dentre elas: clavacina, claviformina, expansina, micoina C e penicidina; foi utilizada também como *spray* para nariz e garganta no tratamento do resfriado comum, e como pomada para o tratamento de infecções da pele. Contudo, durante a década de 60 tornou-se claro que, apesar de apresentar atividade antibacteriana, antiviral e antiprotozoário, ela poderia também ser tóxica a animais e plantas. Após estes estudos ela foi, então, reclassificada como uma verdadeira micotoxina (CIEGLER *et al.*, 1971; CIEGLER, 1977; BENNETT e KLICH, 2003; FREIRE *et al.*, 2007).

A patulina é imunossupressora e há evidência limitada de carcinogenicidade em animais experimentais (JECFA, 1995 e KAWASHIMA, 2004). Quimicamente, a patulina é uma lactona heterocíclica insaturada (Figura 10).

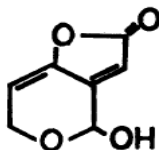


Figura 10. Estrutura química da patulina (KAWASHIMA, 2004).

Alguns fungos produtores de patulina podem produzi-las em temperaturas abaixo de 2°C (____, 2009), sendo estável ao calor e a presença de ácidos. Essas micotoxinas podem ser encontradas em pães mofados, linguiças, frutas (incluindo bananas, peras, abacaxis, uvas e pêssegos), suco de maçã, sidras e outros produtos. Justamente com a citrina e a ocratoxina A, a patulina tem sido identificada a partir de produtos alimentícios mofados (KAWASHIMA, 2004).

Existe o risco para a saúde pública devido à exposição a patulina produzida por espécies de *Penicillium*, especialmente *P. expansum* (suco de maçã) e *P. sclerotigenum* (inhame) é ainda maior (IAMANAKA, OLIVEIRA e TANIWAKI, 2010), uma vez que *P. sclerotigenum* foi capaz de infectar e se estabelecer em maçã, banana, pêra e beterraba, além do inhame. Essas possibilidades de infecção sugerem a necessidade de realização de pesquisas para detecção e determinação da concentração de patulina em tais alimentos (OLIVEIRA *et al*, 2006).

7. FUMONISINAS

Fumonisin são micotoxinas produzidas por várias espécies de *Fusarium*, principalmente *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon), um dos fungos mais comumente associado ao milho. Estão amplamente distribuídas e sua ocorrência natural em milho e produtos derivados é constatada em muitas regiões do mundo. Altas concentrações de fumonisinas têm sido registradas em milho cultivado e particularmente consumido por populações de países em desenvolvimento, tais como em culturas de subsistência (SCAFF, 2003). Por outro lado, também são verificadas consideráveis variações anuais nos níveis de contaminação por fumonisinas (Figura 11).

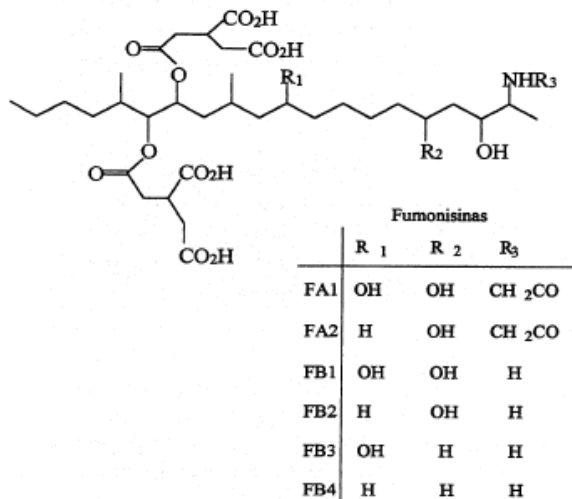


Figura 11. Estruturas químicas das principais fumonisinas (KAWASHIMA, 2004).

Outras espécies de *Fusarium* também produtoras de fumonisinas, foram reveladas, são elas: *proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. napiforme*, *F. dlamini*, *F. globosum*, *F. subglutinans*, *F. polyphialidicum*, *F. oxysporum* (POZZI *et al.*, 2002; HINOJO *et al.*, 2006 apud FERNANDES, 2007).

Quanto aos efeitos advindos do consumo de insumos alimentares contaminados por fumonisinas, Ono e colaboradores (2004) constataram que as fumonisinas causam leucoencefalomalacia em equinos e edema pulmonar em suínos. Além disso, em seres humanos, altos níveis de fumonisinas em derivados de milho têm sido associados com câncer esofágico na África do Sul e China (KELLER-MAN *et al.*, 1990 e HARRISON *et al.*, 1990; RHEEDER *et al.*, 1992; CHUeLI, 1994 apud ONO *et al.*, 2004).

As toxinas de *F. verticillioides* foram classificadas pela 'International Agency for Research on Cancer' como possivelmente carcinogênicas para seres humanos (IARC, 2002). As mesmas constatações foram feitas por Iamanaka, Oliveira e Taniwaki (2010), os quais verificaram que as fumonisinas têm exibido uma atividade promotora de câncer em ratos, mas não são mutagênicas. Ainda não há informação suficiente para determinar se as fumonisinas são carcinogênicas ao homem, contudo existe uma possível associação do câncer esofágico humano, causado pela ingestão de grãos contaminados

por *F. verticillioides* contendo fumonisinas e fusarina C. As fumonisinas são estáveis na maioria dos alimentos processados.

As fumonisinas são hidrossolúveis, o que tem dificultado seu estudo. É provável que muitas outras micotoxinas permaneçam ainda desconhecidas, graças a essa característica de hidrossolubilidade (FREIRE *et al*, 2007).

8. LEGISLAÇÃO PARA FUNGOS E MICOTOXINAS

8.1 Fungos

Fungos são organismos multicelulares filamentosos que podem crescer em grãos e alimentos e produzem substâncias tóxicas chamadas de micotoxinas (NONES *et al*, 2014). No que diz respeito aos parâmetros microbiológicos relativos à contagem padrão em placa, não há uma resolução nacional que estabeleça um limite máximo para fungos em cereais. Entretanto, a presença de fungos no milho (também chamado de grãos ardidos, conforme Figura 12), especialmente fungos toxigênicos podem ser indicativos de deterioração e contaminação por micotoxinas.



Figura 12. Comparação de amostras de grãos de milho ardidos (A) e saudáveis (B) (COSTA *et al*, 2009).

De acordo com o processamento realizado com o milho, a contagem padrão de fungos e leveduras pode ser bastante diversificada, pois seu desenvolvimento irá depender do tipo de substrato e das condições ambientais.

8.2 Micotoxinas

Serra (2005) ressalta que sendo as micotoxinas contaminantes naturais, é impossível assegurar a isenção completa das mesmas nos produtos alimentares, mas que a sua presença pode e deve ser minimizada a níveis que não representem risco para a saúde, empregando o princípio de ALAR, que significa “tão baixo quanto seja possível”.

No Brasil, a resolução nº 07/2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que os níveis de micotoxinas deverão ser tão baixos quanto razoavelmente possível, devendo ser aplicadas as melhores práticas e tecnologias na produção, manipulação, armazenamento, processamento e embalagem, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido. A resolução estabelece ainda os limites máximos toleráveis (LMT) para aflatoxinas (AFLs - AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂, AFM₁), fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA), deoxivalenol (DON), zearalenona (ZON), além de patulina e citrinina em diferentes alimentos (BRASIL, 2011).

Para milho (grão, farinha, sêmola) e outros produtos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2011), os LMTs para AFLs totais (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂), ocratoxina A e fumonisinas de 20, 20 e 5.000 µg/kg em cereais em grãos para posterior processamento, respectivamente (com exceção do trigo), para adequação até 2014, conforme Tabela 2.

No entanto, em dezembro de 2013, uma nova resolução entrou em vigor prorrogando o prazo limite para adequação destes limites (Tabela 2) para primeiro de janeiro de 2017 (BRASIL, 2013), uma vez que produtores de grãos, unidades armazenadoras e indústria deverão atender os limites previstos na legislação, implantando medidas de controle mais rigorosas a fim de reduzir ainda mais os teores de fungos e micotoxinas, sem causar escassez de alimentos disponíveis no mercado.

Tabela 2 - Limites máximos toleráveis para concentração de micotoxinas no Brasil em 2015 e 2017

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg) em 2015
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Desoxinivalenol	Trigo e milho em grãos para posterior	3000

(DON)	processamento	
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Fumonisininas (B1 + B2)	Milho em grão para posterior processamento	5000
Zearalenona	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400
Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg) em 2017
Desoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	750
Fumonisininas (B1 + B2)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000
Zearalenona (Zea)	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
	Arroz beneficiado e derivados	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e derivados à base de milho	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	200

(BRASIL, 2011; 2013).

A possibilidade de co-ocorrência de micotoxinas em alimentos suscita preocupações acrescidas, visto que se desconhecem os efeitos das interações entre estes compostos. Já foi detectada a co-ocorrência de patulina e citrinina em maçãs portuguesas (MARTINS *et al.*, 2002) e de aflatoxina B1, fumonisina B1 e OTA em cereais (PARK *et al.*, 2002; VARGAS *et al.*, 2001, apud SERRA, 2005).

Inúmeros estudos constataram que a prevenção da formação de micotoxinas seja a forma de controle mais desejável, visto que as micotoxinas são estáveis quimicamente, resistentes ao processamento, por resistirem às altas temperaturas e que outras formas de combate às micotoxinas, como as técnicas de destoxificação na maioria das vezes não são economicamente viáveis. No entanto, adicionalmente à prevenção, existem vários esforços neste sentido, que focalizam no processamento alimentar, na remoção de micotoxinas por adsorção, filtração, moagem, solventes, altas temperaturas e destoxificação por microorganismos (SINHÁ, 1998 apud SERRA, 2005).

9. CONTAMINAÇÃO DO MILHO E SEUS PRODUTOS POR FUNGOS E MICOTOXINAS

9.1 Internacional

As micotoxinas são encontradas em diversas culturas de plantas no mundo inteiro (DOOHAN *et al*, 2003 e JAY *et al*, 1992 apud SILVA, 2005).

Com relação à saúde do homem, as fumonisinas tem sido correlacionadas com maior incidência de câncer de esôfago em alguns países, como regiões da África, Estados Unidos da América, Itália e China, onde foram encontradas maiores concentrações desta micotoxina nos alimentos (SHEPARD *et al*, 2000; THIEL *et al*, 1992 apud BRAGAGNOLO *et al*, 1994; SYDEHAM *et al*, 1990; YOSHIZAYA *et al*, 1994).

Na Itália um estudo foi realizado para verificação da contaminação por deoxivalenol (DON) e fumonisinas (FB₁ e FB₂), em alimentos básicos para sua população (farinha de cereais, pães, massa de grano duro, cereais matinais, biscoitos e alimentos para bebês e infantis). 100% das amostras de farinha de cereais estavam contaminadas por DON, 32% e 31% por FB₁ e FB₂ respectivamente. Dentre os pães, 79% das amostras estavam contaminadas por DON, 29% por FB₁ e 33% por FB₂. 100% das amostras de massa grano duro estavam contaminadas por FB₂ e 44% por DON. Encontraram contaminação por DON em 64% das amostras de cereais matinais, bem como 50% tanto para FB₁ como para FB₂. DON também prevaleceu nas amostras de biscoitos e alimentos infantis para bebês, com 67% e 62% respectivamente (CIRILLO, *et al*, 2003a).

A Tabela 3 reúne vários estudos de diferentes países realizados com amostras de milho e derivados, compilada por Silva (2005).

9.2 Brasil

A incidência de micotoxinas em milho e em produtos derivados tem sido relatada em estudos realizados em vários estados brasileiros (MACHINSKI e VALENTE SOARES, 2000; VAN DER WESTHUIZEN, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2006; KAWASHIMA e VALENTE SOARES, 2006; CRUZ, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013).

No estado do Rio Grande do Sul foram encontradas concentrações significativas de fumonisinas em farinha de milho durante o período de 1998-2000. Das 88 amostras, 33 (37,5%) apresentaram positividade para fumonisinas, sendo os níveis médios e máximos 1146,0 e 7044,0 ppb ($\mu\text{g/kg}$), respectivamente (em 1998) e 315,7 e 1510,0 ppb ($\mu\text{g/kg}$), respectivamente (no ano 2000), o que indica que as práticas agrícolas melhoraram, no entanto parte significativa da população daquele estado consome com grande frequência os derivados de milho, ficando susceptíveis aos efeitos tóxicos desta micotoxina, sendo necessário o monitoramento frequente destes produtos, com interesse na saúde da população (MALLMANN *et al.*, 2001).

No Mato Grosso, centro-oeste do país, amostras de grãos de milho do norte, sul, leste e oeste do estado foram coletadas (safras 2009 e 2010), determinaram a microbiota predominante de *fusarium sp.*, *aspergillus sp.* e *penicilium sp.* nos grãos de milho armazenados após a secagem dos grãos, com umidade segura (13%), sugerindo que a contaminação ocorreu durante o cultivo no campo (BENTO *et al.*, 2012).

Ferreira e colaboradores (2013) no estado de Minas Gerais, encontraram contaminação em 50% e 62,5% das amostras de derivados do milho para as micotoxinas fumonisinas e aflatoxinas respectivamente, sendo que apesar de contaminadas constataram que os níveis se encontravam abaixo dos limites máximos tolerados (LMT) no Brasil (BRASIL, 2011), tanto para aflatoxinas totais (20 $\mu\text{g/g}$), quanto para fumonisinas totais (2000 a 2500 $\mu\text{g/g}$).

Hiiroka e colaboradores (2010), realizaram um monitoramento sequencial em três pontos da cadeia produtiva (campo, recepção e pré-secagem) de duas safras consecutivas (2003 e 2004) da região norte do estado do Paraná e detectaram fumonisinas com níveis variando de 0,07

a 15,32 µg/g em amostras de campo, 0,03 a 15,90 µg/g (recepção) e 0,02 a 18,78 µg/g (pré-secagem), com menor nível na safra-2004.

Se considerarmos o máximo tolerado para o consumo humano como 4,00 µg/g, 80,7% da safra-2003 e 98,8% da safra-2004 estariam adequadas ao processamento de massas. Os níveis de fumonisinas aumentaram gradualmente com o aumento do intervalo colheita / pré-secagem de 3,2 para 8,9 horas ($p < 0,05$), indicando importância de secagem rápida aliada ao constante monitoramento para garantir a qualidade fitossanitária do milho (HIROOKA, *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Concentrações de fumonisinas encontradas em diferentes produtos a base de milho destinados a alimentação humana no mundo (adaptada de SILVA, 2005)

País	Alimento	Nº amos-tras		FB ₁ (mg.kg ⁻¹)		FB ₂ (mg.kg ⁻¹)		Incidência* (nº positivas /total)	Referências
		Intervalo	Média das positivas	Intervalo	Média das positivas	Intervalo	Média das positivas		
África do sul	Fubá	52	Nd - 0,47	0,13	Nd - 0,13	0,08	46/52		
	Canjica	18	Nd - 0,19	0,12	Nd - 0,12				
	<i>Cornflakes</i>	3	Nd	Nd	Nd	Nd	0/3		
	Outros	8	Nd - 0,09	0,08	Nd	Nd	2/8		
Canadá	Fubá	2	Nd - 0,05	0,05	Nd	Nd	1/2		<i>Sydenham et al., 1991</i> (CLAE/ Fluorescência)
Egito	Fubá	2	1,78 - 2,98	2,38	0,47 - 0,78	0,595	2/2		
	Fubá	16	Nd - 2,79	1,04	Nd - 0,92	0,29	15/16		
EUA	Canjica	10	0,10 - 2,54	0,61	Nd - 1,06	0,37	10/10		
	<i>Cornflakes</i>	2	Nd	Nd	Nd	Nd	0/2		
	Outros	7	0,08 - 0,7	0,40	Nd-0,24	0,14	5/7		
Peru	Fubá	4	Nd - 0,66	0,66	Nd - 0,13	0,13	1/4		
	Semolina	55	Nd - 0,79	0,26	Nd - 0,16	0,10	34/55		
	<i>Cornflakes</i>	12	Nd - 0,05	0,05	Nd	Nd	1/12		
	Fubá	7	Nd - 0,11	0,08	Nd	Nd	2/7		<i>Pittet et al., 1992</i> (CLAE/ Fluorescência)
Suíça	Amido de mi-lho; pipoca, tor-tilhas, biscoito e macarrão	17	Nd	Nd	Nd	Nd	0/17		
	Milho doce	7	Nd - 0,07	0,07	Nd	Nd	1/7		
Países do leste e sul da	Fubá	4	0,03 - 0,35	0,18	Nd - 105	0,08	4/4		<i>Doko et al., 1996</i> (CLAE/ Fluorescência)
		2	0,06 - 0,07	0,06	Nd	Nd	2/2		
		1	0,74	0,74	0,38	0,38	1/1		

África		4	0,05 - 1,91	0,62	Nd - 0,62	0,38	4/4	
	<i>Snacks</i>	78	Nd - 2,39	0,45 ± 0,06	Nd - 0,71	0,14 ± 0,02	26/78	
	Milho doce enlatado	24	Nd - 1,08	0,40 ± 0,03	Nd - 0,65	0,06	12/24	
	Pipoca	22	Nd - 1,00	0,34 ± 0,07	Nd - 0,27	0,15 ± 0,02	7/22	Tseng e Liu, 1997
Taiwan	<i>Cornflakes</i>	17	0,14 - 1,28	0,49 ± 0,07	0,12 - 0,46	0,16 ± 0,02	4/17	(CLAE/Fluorescência)
	Canjica	4	Nd	Nd	Nd	Nd	0/4	
	Creme de milho	2	Nd - 0,60	0,60	Nd	Nd	½	
	Outros	6	Nd - 0,07	0,05	Nd	Nd	2/6	
	Polenta	8	Nd - 0,42	0,17	Nd	Nd	3/8	
	Amido	4	Nd	Nd	Nd	Nd	0/4	
	Pipoca	2	Nd - 0,19	0,19	Nd	Nd	1/2	
	<i>Snacks</i>	5	Nd - 0,31	0,23	Nd	Nd	2/5	Piñero <i>et al.</i> , 1977 (CLAE/Fluorescência)
Uruguai	<i>Cornflakes</i>	3	Nd - 0,21	0,21	Nd	Nd	1/3	
	Milho congelado	2	Nd - 0,11	0,11	Nd	Nd	½	
	Milho enlatado	4	Nd	Nd	Nd	Nd	0/4	
Itália	Pipoca, farinha, cuscuz, polenta, biscoitos e <i>cornflakes</i>	27 (convencionais) 27 (orgânicos)	0,02 - 2,16	0,34	0,01 - 0,40	0,02	30%	Cirillo <i>et al.</i> , 2003b
	Creme de milho	8	Intervalo** Nd - 2,40	0,18	0,03 - 0,15	0,12	44%	(CLAE/MS)
Nepal	<i>Cornflakes</i>	2	Intervalo** Nd - 2,40	Médias Positivas** 0,80	6/8	Dejardins <i>et al.</i> , 2000	0/2	

Nota: nd = não detectada. *Incidência de pelo menos uma das FBs. **Soma das FBs (FB₁ + FB₂ + FB₃) em mg.kg⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO (ABIMILHO). **Processamento de milho**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/>> Acesso em: 08/09/2008.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 336- 342, 2006.

AMARAL, R. C. e BERNARDES, T. F. Conhecendo e escolhendo híbridos de milho para silagem. **Radar Técnico: Ovinos e Caprinos**, AgriPoint. Publicado em: 02/10/2012. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/ovinos-e-caprinos/conhecendo-e-escolhendo-hibridos-de-milho-para-silagem-80791n.aspx>> Acesso em: 11/01/ 2016.

ALVARENGA, L. A. Precipitação no sudeste brasileiro e sua relação com a Zona de Convergência do Atlântico Sul. **Revista Agrogeoambiental**, v.4 n.2, agosto, 2012.

AOAC. Association Official Method of Analysis of AOAC internacional. **Official Method 995.15. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ in corn**. Eds: William Horwitz and George W. Latimer, 18 th Edition, 2005.

AYRES, J. C. Significance of food mycology - an overview. In: **Food Mycology**. Rhodes M. E. Ed. G. K. Hall Co., Massachussets, p. 3 -10, 1979.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. **New York: Macmillan Publishing Company**, 218p.,1986.

BEBER-RODRIGUES, M. e SCUSSEL, V. M. Mycoflora and Mycotoxicological Quality of Four Freshly Harvested Paddy Rice Cultivars and Relation with Harvest to Industry Reception Timing. **Rice Science**, 2013, 20(4): 303–308, 2013. DOI: 10.1016/S1672-6308(13)60151-1.

BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v.16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BENTO, L. F., CANEPPELE, M. A. B., ALBUQUERQUE, M.C.F., KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C., ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, n. 71(1):p.44-49, 2012.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 16, p. 117-120, 2005.

BLOUT, W. P. Turkey "X" disease. **Turkeys**, v. 9, p. 52-58, 1961.

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A.; RITIENI, A.; MORETTI, A.; RANDAZZO, G.; CORDA, P. *Beauvericin and fumonisin B₁ in preharvest Fusarium moniliforme maize ear rot in Sardinia*. **Food Addit. Contam.** v12 (4): 599-607, 1995.

BRAGAGNOLO, N. E TOLEDO, M.C. F. **Fumonisinás: Um Novo Grupo de Micotoxinas**. Boletim Informativo SBCTA, v.28(2), p. 151-160, 1994.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da colheita brasileira de grãos, v. 2 - safra 2014/15, n. 11**. 11º levantamento, agosto, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/Arquivos/15_08_18_10_30_18_boletim_graos_agosto_2015.pdf> Acesso em: 2015/11/11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Análise de resíduos e contaminantes em alimentos / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 32p, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013**. Diário Oficial da União – Seção 1. Nº 252, p. 756. 30 de dezembro de 2013a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de coleta de amostras do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS p.37, 2013b.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Vamos conhecer o Brasil, nosso território, relevo e clima**. Disponível em: <<http://7a12.ibge.gov.br/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/relevo-e-clima>>. Acesso em: 18/01/2015.

BRASIL, Instituto Nacional de Pesquisa Espacial (INPE). **Clima da Amazônia**. In: FISCH, G.; MARENGO, J. A.; NOBRE, C. A. Boletim 03, Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, 1998. Disponível em: <<http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/boletim/cliesp10a/fish.html>> Acesso em: 18/01/2015.

BRASIL. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). **Monitoramento Brasil – temperatura mínima; temperatura máxima e precipitações totais em janeiro/2014**. Disponível em: <<http://clima1.cptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt>> Acesso em: 18/01/2015.

BRASIL. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). **Monitoramento Brasil - Precipitações observadas em julho/2014**. Disponível em: <<http://clima1.cptec.inpe.br/monitoramentobrasil/pt>> Acesso em: 18/01/2015.

BRASIL, Supeintendência de Desenvolvimento da Amazônia - SUDAM. **Amazônia Ocidental**. Decreto-Lei N. 356 de 28.02.1967.

BULLERMAN, L.B. e TSAI, W-Y.J. *Incidence and levels of Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds*. **J. Food Prot.**, 57 (6): 541-546, 1994.

BUTLER, W.H. **Aflatoxin**. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) *Mycotoxins*. Elsevier, 1-28, 1974.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 430p. p.157-179. Campinas, 2002.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Rev Saúde Pública**, v. 36(3): p.319-23, 2002.

CALVET, R.M. **Isolamento e identificação de fungos toxígenos em carcinicultura marinha**. 81 f., 2008. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

CARDOSO, F. C. FILHO, MURATORI, M. C. S. **Monitoramento de fungos toxigênicos e aflatoxinas em rações utilizadas na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil**, 2011. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina.

CASTRILLON, A. L.; PURCHIO, A. Ocorrência de aflatoxinas em castanhas do Pará (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl., 1808). **Acta Amazônica**, v. 18, n.1/2, p. 49-56, 1988.

CIEGLER, A.; DETROY, R. W.; LILLEJOJ, E. B. *Patulin, penicillic acid and other carcinogenic lactones*. In: CIEGLER, A.; KADIS, S.; AJL, S. J. (Ed.). **Microbial toxins**, New York: Academic Press, v. 6, p. 409-434, 1971.

CIEGLER, A. **Patulin**. In: RODRICKS, J. V.; HESSELTINE, C. W.; MEHLMAN, M. A. (Ed.). *Mycotoxins in human and animal health*. Park Forest South: Pathotox, p. 609-624, 1977.

CIRIO, G. M. **Deteção e controle de fungos em sementes de milho (*Zea mays* L.) armazenadas**. Teses e dissertações – UNIVEERSIA – Biblioteca, 2013.

CIRILLO, T.; RITIENIY, A.; GALVANOZ, F. e AMODIO COCCHIERIY, R. **Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B₁ and B₂ in Italian marketed foodstuffs**. Food Additives and Contaminants. Vol. 20, No. 6, 566–571. June, 2003a.

CIRILLO, T., RITIENI, A., VISIONE, M., COCCHIERI, R. A. **Evaluation of conventional and organic Italian Foodstuff for Deoxyvaenol and fumonisins B₁ and B₂**. J. Agric. Food Chem. v. 51: 8128-8131p., 2003b.

COLE, R.J. e COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, 937p, 1981.

CRUZ, J. V. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 73 f., 2010. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

CULLEN, J.M. e NEWBERNE, P.M. **Acute hepatotoxicity of aflatoxins**. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) *The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press Inc., 3-26, 1994.

DALPASQUALE, V.A. Modelo matemático para simulação de resfriamento de produtos agrícolas em fluxos contracorrentes. **Acta Scientiarum**, Maringá, PR, v.24, n.5, p.1213-1217, 2002.

DECAGON Devices Inc. **Water activity mater: operator's manual**. 3. ed.:185 p., Pulman, WA: Decagon, 2001.

DESJARDINS, A. E., MANANDHAR, G., PLATTNER, R. D., MARAGOS, C. M., SHRESTHA, K., e MCCORMICK, S. P. *Occurrence of Fusarium species and mixcotoxins in Napalese Maize and wheat and effect of traditional processing methods on mycotoxins levels*. **J. Agric. Chem.** v. 48: 1377 – 1383p., 2000.

DOOHAN F.M., BRENNAN J., COOKE B.M. *Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109: p. 755–768, 2003.

DOKO, M.B., CANET, C., BROWN, N., SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S., SIAME, B.A. *Incidence and levels of fumonisinas and zearalenone in cereals and cereal-based foods form eastern and southAfrica*. **J. Agric. Food Chem.** v. 44: 3240 – 3243p., 1996.

DOLL, R. e PETO, R. *The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*. **Journal of National Cancer Institute**, v. 66, 1191-1308 p., 1981.

DUARTE, S. C., PENA, A., LINO C. M. *A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products*. **Food Microbiol**, 27: 187–198, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do Milho**. Sistema de Produção, 1. ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 6^a edição. Set./2010. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/manejo milho.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/manejo_milho.htm)> Acesso em: 09/07/2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. GODINHO. V. P. C. **Sistema de produção para a cultura do milho em Rondônia**. 3ª Ed. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2008. 46 p. – (Sistemas de Produção / Embrapa Rondônia, 0113-1668; 32).

FERNANDES, R. R. G., **Micotoxinas: a situação actual da legislação e metodologias analíticas**, 2007. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro: Portugal.

FERREIRA, P., QUEIROZ, V. A. V., CONCEIÇÃO, R.R. P., MIGUEL, R. A. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.1, p. 54-60, 2013.

FIALHO, E. T., Barbosa, H. P. **Alimentos Alternativos para Suínos. Lavras – MG. FAEPE** 175 p. 2005.

FISCH, G., MARENGO, J. A., e NOBRE, C. A. Uma revisão geral sobre o clima da Amazônia. *Acta Amazonica*, 28, 101–126, 1998.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, As Micotoxinas. **Food Ingredients Brasil**, nº 7, 2009. Disponível em: <www.revistafi.com/materias/90.pdf> Acesso em: 28/06/2013.

FORGACS, J. *Mycotoxicooses - the neglected diseases*. **Feedstuffs**, Mineapolis, v. 34, p. 124-134, 1962.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. *Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels*. **Mycopathologia**, v. 145, p. 95-103, 1999.

FREIRE, F. C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R. R. M. *Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts*. **Mycopathologia**, v. 149, p. 13-19, 2000.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza - CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

FREITAS, E. S.; SAKAMURA, N. K., NEME, R.; BARBOSA, N.A.A. Valor nutricional do milho processado, usado na ração pré-inicial para frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.4, p.510-517, 2005.

FUJII, S.; GARCIA, L. B.; HIROOKA, E. Y. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – Ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 273-284, 2004.

GALVANI, E. **Unidades Climáticas Brasileiras**. Climatologia I, Departamento de Geografia, Universidade de São Paulo - USP, _____. Disponível em: <<http://www.geografia.flch.usp.br/graduacao/apoio/>>

Apoio/Apoio_Emerson/Unidades_Climaticas_Brasileiras.pdf> Acesso em: 27/01/2015.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 665p.

GIMENO, A. *Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al alimentación animal*. 2000 Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>.> Acesso em 2 abr. 2008.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H.F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R.; ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grãos. **Ciênc.Agrotec.** vol.27 no.3 Lavras May/June 2003.

GONZALES-PEÑA, E., LEACHEA, C., CERAINB, A. L., LIZARRAGAA, E. *Comparison between capillary electrophoresis and HPLC-FL for ochratoxin A quantification in wine*. **Food Chem.** 97, 349-354, 2006.

HAGLER, W. M.; TOWERS JUNIOR, N. R.; MIROCHA, C. J.; EPPLEY, R. M.; BRYDEN, W. L. *Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen?* In: SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F.; BACKHOUSE, D.; BRYDEN, W. L.; BURGESS, L. W. (Ed.). *Fusarium*. St. Paul: APS Press, p. 321-331, 2001.

HERMANNNS, Gislaine; PINTO, Flávia T.; KITAZAWA, Samira E.; NOLL, Isa B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Revista Ciência Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, 26(1): 7-10, jan.-mar. 2006.

HINOJO, M., MEDINA, A., VALLE-ALGARRA, F., GIMENO-ADELANTADO, J., JIMÉNEZ, M., e MATEO, R. *Fumonisin production in rice cultures of Fusarium verticillioides under different incubation conditions using an optimized analytical method*. **Food Microbiology**, v. 23, p. 119-127, 2006.

HIROOKA, E.Y.*; ONO, E.Y.S.; BERND, L.P.; ZUCARELI, C.; GERAGE, A.C.; ANDRADE, D.S.; HOMECHIN, M.(in memorian); TAKAHASHI, H.W.; GARCIA, G.T.; ITANO, E.N.; SUGIURA, Y.; KAWAMURA, O. **Micotoxinas na cadeia produtiva de milho**. Set, 2010. Disponível em: <http://abms.org.br/cn_milho/palestras/004.pdf> Acesso em: 05/01/2015.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. *Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals*. **Toxicol.** 167, 101-134, 2001.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKA, M. H. **Micotoxinas em Alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Some occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, IARC, v. 56, p. 445 – 446, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements: A complete list*. v.82, *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. *International Research on Cancer, World Health Organization: Lyon, France*, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Trad. Eduardo Cesar Tondo. Rio Grande do Sul (Porto Alegre): Artmed, 710p., 2005.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Safety evaluation of certain food additives and contaminants*. Geneva: World Health Organization, 1995.

JOBIM, C. C., GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. **Qualidade Sanitária de Grãos e de Forragens Conservadas “versus” Desempenho Animal e Qualidade de seus Produtos**. Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas. Maringá, p.242-261, 2001.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidas e comercializadas em diferentes regiões do Brasil**. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. **Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, p. 516-521, 2006.

KELLER, K.M; QUEIROZ, B. D.; KELLER, L. A. M.; CAVAGLIERI, L.R.; PEREYRA, M.L.G.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R. *The*

mycobiota and toxicity of equine feeds. Veterinary Research Communications, v. 31, n. 8, p. 1037-1045, 2007.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus species on stored products*. **Mycological** n. 161, 1. CAB International Mycological Institute, Kew, 1989.

KUIPER-GOODMAN, T. *Prevention of human mycotoxicosis through risk assessment and risk management*. In: Miller J.D. e Trenholm H.L. (eds) *Mycotoxins in grains*. St Paul. Minnesota. USA. Eagan Press. p.439-470, 1994.

LEITE, L. **Cultura do Milho**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. pág.12 Tocantins: Jul.2014. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/yronmoreira3/a-cultura-do-milho>> Acesso em: 18/01/ 2015.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. *Commercial poultry nutrition*. 2.ed. Guelph: University Books, p.355, 1997.

LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Metodologias Analíticas para Determinação das Fumonisinas em Milho e Alimentos à Base de Milho. **Rev. Quim. Nova**, v. 29, n. 2 p 293-299, 2006.

LÓPEZ-OVEJERO, R. F.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLA, M.; BARELA, J. F. **Manejo de plantas daninhas na cultura do milho**. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. (Eds.). *Milho: Estratégias de Manejo para Alta Produtividade*. Piracicaba: Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, 2003.

LORINI, I. Qualidade na armazenagem de grãos: vedação de armazéns e o expurgo dos grãos. **Grãos Brasil**, Maringá, PR, n.20, p.19-20, 2005.

MACHINSKI JR, M.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisins B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, p. 875-879, 2000.

MALLMANN, C.A., ALMEIDA, C. A. A., MILBRADT, E. L., KOWALSKI, C. H., DILKIN, P. **Ocorrência de fumonisinas em farinha de milho no sul do Brasil**. In: I Congresso panamericano de centros de informação e controle toxicológico, 2001. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/papers/30a.pdf>> Acesso em: 01/05/2015.

MALLMANN, C. A.; VASCONCELOS, T. G.; TYSKA, D. e MARTINS, A. C. **Comparação de metodologias analíticas e de amostragem para micotoxinas**. LAMIC, Universidade Federal de Santa Maria / DACT e DMPV, Santa Maria – RS, Brasil, 2011.

MÁRCIA, B.A., LÁZZARI, F.A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, n. 4. Campinas Out./Dez. 1998. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400001>>

MARQUARDT, R.R. e FROHLISH, A.A. *A review of recent advances in understanding ochratoxycosis*. **Journal of Animal Science**, 70, 3968-3988, 1992.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.

MILLER, J.D. *Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research*. **J. Stored Prod. Res.**, v.31 (1): 1-16, 1995.

MOREIRA, I.; ROSTAGNO, H.S.; TAFURI, M.L. *et al.* Uso de milho processado a calor na alimentação de leitões. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, v.23, p.412-421, 1994.

MOSS, O.M. *Mode of formation of ochratoxin A*. **Food Additives and Contaminants**, 13 (supplement), 5-9, 1996.

NGUNDI M.M., SHRIVER-LAKE L.C., MOORE M.H., LASSMAN M.E., LIGLER F.S., TAITT C.R. *Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals in beverages*. **Anal. Chem.** v.77: p. 148–154, 2005.

NONES, J., SAVI, G. D., HORN, M. B. SCUSSEL, V. M. *Evaluation of fungi and fumonisins in swine feed and its ingredients on a farm in Santa Catarina, Brazil*. **Revista eletrônica Nutritime** - ISSN 1983-9006. Artigo 236, v. 11 – n. 02, p. 3238 – 3245. Março/Abril, 2014.

NORRED, W.P. Fumonisin - Mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.38: p.309-328 , 1992.

NUNES, E.M.C.G. **Microbiota fúngica nos ingredientes e em ração para piscicultura**. 58 f., 2009. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L.; BIRD, C.; PINTO, C. A. *Immunochemical assessment of aflatoxin M1 in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil*. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 1, p. 7-10, 1997.

OLIVEIRA, I.S., MOURA, R.M., LUZ, E.D.M.N., MAIA, L. Patogenicidade de *Penicillium sclerotigenum* a diferentes frutas e hortaliças em pós-colheira. **Fitopatologia Brasileira** 31:408– 410. 2006.

OMS. Organizacion Mundial de la Salud. **Crterios de salud ambiental 11, Micotoxinas**. Organización Panamericana de la Salud, 133p., 1983.

ONO, E. Y. S.; MENDES, A. M.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos - Progressos na imunodeteção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 32. Jan-Jun p. 69-80, 2004.

PARK JW, KIM EK, SHON DH, KIM YB. *Natural co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea*. **Food Additives and Contaminants** 19 (11): 1073-80, 2002.

PEREIRA, K. C. e SANTOS, C.F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. Ano 15, n.4, p. 147-165, 2011.

PEREIRA, M. M. G. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev., 2005.

PEREIRA, P.R.V.S. **Comparação entre métodos para detecção de Coleópteros adultos (Insecta: Coleoptera) e ocorrência de fungos em trigo armazenado**, 1994. Dissertação de Mestrado em Entomologia - Pós Graduação em Ciências Biológicas da UFPR, Curitiba, PR.

PITT, J.I. *The genus *Penicillium* and its teleomorphics states *Eupenicillium* and *Talaromyces**. London: Academic Press, 634p., 1979.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. **Aspectos Relacionados à Ocorrência e Mecanismo de Ação de Fumonisinás**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

RAISUDDIN, S. *Toxic responses to aflatoxins in a developing host*. **Journal of Toxicology: Toxin Review**, v. 12, p. 175-201, 1993.

RAPER, K. B.; FENNELL, D.I. *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams eWilkins Company, 686p., 1965.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas**. 174f., 2010. Tese de Doutorado em Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/.../42/.../LilianaOliveiraRocha_Doutorado.pdf> Acesso em: 22/01/2014.

RODRIGUES, A. **Efeito Estufa Um problema que envolve todas as nações**, 1994. FBDS - Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável, Bloch Ed. p.24.

ROSA, C. A.R. RIBEIRO, J.M.M.; FRAGA, M.J.; GATTI, M.; CAVAGLIERI, L.R.; MAGNOLI, C.E.; DALCERO, A.M.; LOPES, C.W.G. *Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated Aspergillus and Penicillium species*. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n.1-2, p.89-96, 2006.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARINI, L. J.; ELIAS, M.C. *Hermetic and conventional storage systems in oat grains conservation*. **Cienc. Rural**, v. 34, n. 6: Santa Maria, Nov. /DeZ. 2004.

SANTOS, C. C. M.; LOPES, M. R. V.; KOSSEKI, S. Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/ SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 153-157, 2001.

SANTOS, A.B. *et al.* **Avaliação microbiológica em derivado de milho**. Resumos Evento Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. Disponível em: <www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0401-2.pdf> Acesso em: 27/02/2014.

SANTOS, F. C. F. **Fungos em rações para camarões cultivados no Estado do Piauí**. 53 f., 2006. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

SANTOS, G., NAEHER, K., ENCARNACAO, P. Prevalencia de micotoxinas en los ingredientes de alimentos acuícolas. **Aquafood Internacional**. Nov, 2013. Disponível em: <<http://aquafeed.co/prevalencia-de-micotoxinas-en-los-ingredientes-de-alimentos-acuicolas/>> Acesso em: 26/01/2015.

SANTURIO, JM. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** v.2, n.1, p.01-12, 2000.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; NETTO, D. P. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região Norte do Estado do Paraná. **Semina**, v.24, p. 63- 72, 2003.

SCAFF, R. M. C. **Fumonisinhas em derivados de milho comercializados em Santa Catarina e sua relação com a saúde humana e alterações histopatológicas em fígado de catfish tratados “in vivo” com fumonisinha B1.** p. 117, 2003. Tese de Doutorado e Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFSC: Florianópolis: SC.

SCOTT, P.M. *Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins in cereal grains.* J. CHELKOWSKI (Ed.), Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage, Elsevier, Amsterdam. p. 529–572, 1991.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em grãos armazenados.** In: LORINI, I.; MIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M.(ed). Armazenagem de grãos. Campinas: IBG, p. 675-804, 2002.

SERRA, R. **Microflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para ocratoxina A.** 2005. Tese de doutorado em engenharia química e biológica, Universidade do Minho, Portugal.

SHEHARD, G. S, MARASAS, W. F., LEGGOTT, N. L. YAZDANPANAH, H. RAHIMIAN, H. SAFAVI, ,N. *Natural occurrence of fumonisinhas in corn from Iran.* **J. Agric. Food Chem.** May;48(5):1860-4, 2000.

SILLIKER, J. H., ELLIOT, R. P., BAIRD-PACKER, A. C., BRYAN, F. L., CHRISTIAN, J. H.B., CLARK, D. S., OLSON, J. C., ROBERTS, T. A. Jr. *Cereales y sus productos derivados.* Cap. 23. In: *Ecologia microbiana de los alimentos.* p. 278. Vol. II. Ed. Acirbia. S.A. Zaragoza, Espanha, 1985.

SILVA, A. C. S. **Fumonisin em produtos de milho: Metodologia, análise e avaliação de risco.** 134p., 2005. Dissertação de mestrado em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília: Distrito Federal, DF.

SILVA, N. da; TANIWAKI, M. H.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; NASCIMENTO, M. S. do; GOMES, R. A. R. *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual.* Instituto de Tecnologia em Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brazil. CRC Press/Balkema, Taylor & Francis Group, London: UK, 484p., 2013.

SIMAS, M. M.; BOTURA M. B.; CORREA, B. *Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil.* **Food Control**, v.18, p. 404-408, 2007.

SIMON, C. e DEFRIES, R. S. **Uma terra, Um Futuro;** Traduzido por Maria Cláudia S.R. Ratto; São Paulo: Makron Books, p.189, 1992.

SINHA, K. K. *Detoxification of Mycotoxins and Food Safety.* In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety.* New York: Eds. Marcel Dekker, p. 381-406, 1998.

SINHA, K.K. e SINHA, A.K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **J. Stored Prod. Res.**, v.27 (1): 65-68, 1991.

SMITH, J. E.; SOLOMONS, G.; LEWIS, C.; ANDERSON, J. G. *Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health.* **Natural Toxins**, England, v. 3, n. 4, p. 187-192, 1995.

SOARES, T. J., HIGUCHI, N. *The UN convention on climate change and the pertinent Brazilian legislation with emphasis on the Environmental legislation in the State of Amazonas.* **Acta Amaz.** v.36, n.4. Manaus, Oct./Dec. 2006.

SOUFLEROS, E. H., BOULOUMPASI, E., TSARCHOPOULOS, C. e BILIADERIS, C.G. *Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage.* **Food Chemistry, Reading**, v. 80, p. 261-273, 2003.

STEYN, P.S. *Ochratoxins and related dihydroisocoumarins.* In: BETINA, V. (ed.), *Mycotoxins: Production, Isolation, Separation and Purification.* Elsevier Science Publishers, 183-216, 1984.

SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., STOCKENSTROM, S. *Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, n. 9, p. 2014-2018, 1991.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em Alimentos – Ocorrência e Detecção**. Campinas, SP: Núcleo de Microbiologia - Instituto de Tecnologia de Alimentos. 82 p., 2001.

TAVEIRA, J. A.; MIDIO, A. F. Aflatoxina M1 - A micotoxina do leite. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 115-126. 1999.

TEIXEIRA, A.S. *et al.* Análise e Quantificação de Aflatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Em Amostras De Castanha-Do-Brasil. **Revista Ciên. Vida Seropédica**, RJ, EDUR, v.28 suplemento, 2008.

THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S. e GELDERBLUM, W.C.A. *The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health*. **Mycopathologia**, 117, 3-9, 1992.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

TURCI, J. C.; SOARES, R. T. R. N. **Equações de predileção do valor energético do milho de diferentes qualidades para suínos**, p. 16. Dissertação de mestrado em Ciência Animal. Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2011.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. *Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 5574-5578, 2003.

VAREJÃO-SILVA, M.A. **Meteorologia geral I**. Campina Grande: Editora Universitária, p. 1-449, 2005.

VARGAS, E. A.; SANTOS, E. A.; PITTET, A. *Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography: collaborative study*. **J. AOAC Int.**, 88(3), 773-779, 2005.

WEBER, E.A. **Armazenagem Agrícola**. Ed. Agropecuária, p. 692. Guaíba, RS: 2005.

WEBER, E.A. **Armazenagem agrícola**. 2. ed. Agropecuária, p. 396. Guaíba, RS: 2001.

YANAKA, E.K. ; NETTO, D.P. ; SASSAHARA, M. Avaliação da presença de micotoxinas em milho e rações destinadas à avicultura comercial de postura nas regiões norte e noroeste do Estado do Paraná. **Pesq. Vet. Bras.**, v.24, supl.1, p.79, 2004.

YIANNIKOURIS, A. Perito do mês... Dr. Alexandros Yannikouris: **Micotoxinas e a história**. Disponível em: <<http://www.knowmycotoxins.com/pt/documents/AlexandrosPOR.pdf>>. Acesso em: 06/07/2013.

YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A. e LUO, Y. *Fumonisin occurrence in corn from high- and lowrisk areas for human esophageal cancer in China*. **Appl. environ. Microbiol.**, 60, 1626–1629, 1994.

CAPÍTULO II – ARTIGO I: Submetido em inglês na revista Food Microbiology, 11/03/2016 (confirmação – Anexo III).

QUALIDADE E SEGURANÇA DE GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM UNIDADES DE ARMAZENAMENTO DO ESTADO DE RONDÔNIA - REGIÃO NORTE DO BRASIL

VALMORBIDA, Roberta^a; SAVI, Geovana D.^a; SILVA, Juliana R.^a; SOARES, Carlos E. S.^a; NASCIMENTO, Priscila N.^{b,c}; SCUSSEL, Vildes M.^a

^aLaboratório de Micotoxilogia e contaminantes alimentares, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. ^bFaculdade da Amazonia.

^cEstagiária PIBIC - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Milho e Sorgo, Vilhena, Rondônia, Brasil.

RESUMO

Foram avaliadas a qualidade (danos / umidade) e a segurança (fungos / fumonisinas - FBs) de grãos de milho (*Zea mays* L.) de diferentes unidades armazenadoras de grãos (UAGs), localizado na principal região produtora de Rondônia (RO), região Norte do Brasil. Foram coletadas amostras de grãos de milho seco (total 76) armazenados em quatro UAGs (município de Vilhena) de julho a novembro de 2014 (n = 4 / mês) e avaliadas por danos (grãos quebrados, bolorados, fermentados, presença de insetos e matéria estranha), umidade (teor de umidade - mc / atividade água - a_w), fungos (contagem total - TFC, gêneros e espécies) e FBs (FB₁, FB₂). As condições climáticas (dados de temperatura, umidade relativa - UR, precipitação) também foram obtidos a partir do plantio até períodos de armazenamento. Em relação amostras de umidade, o mc e a_w variou de 10,03-16,10% (média de 13,20) e 0,52-0,80 (média de 0,62), respectivamente. O principal dano encontrado foi o de grãos fermentados, seguido por grãos quebrados. Como esperado, esporos de fungos estavam presentes em 94,8% das amostras, entre os quais, cinco gêneros foram isolados e 16 espécies

identificadas, onde prevaleceu o gênero *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* e *Penicillium*. Outros gêneros de campo, tais como *Cladosporium* e *Mucor* foram isolados. A contagem máxima de fungos foi de $2,2 \times 10^3$ UFC/g. Em relação a FBs, 52,63% das amostras (40) estavam acima do limite de quantificação (FB_{total} 43,80 µg/kg) e abaixo dos limites máximos tolerados (LMT) do Brasil e Estados Unidos (5000/4000 µg/kg). Apenas 9,20% (7) continham níveis acima do regulamento da UE (LMT: 1000 mg/kg). Este é o primeiro estudo sobre FBs em milho realizado na região Norte do Brasil.

Palavras-chave: milho; unidade de armazenamento; clima tropical; fungos; fumonisinas.

1. INTRODUÇÃO

O Milho (*Zea mays* L.) cresce em regiões quentes em todo o mundo, sendo a maior produção de cereais no Brasil (LOPES-OLIVEIRA *et al*, 2003; ROCHA, 2010). A temperatura durante o seu desenvolvimento (da emergência ao florescimento) varia de 24 a 30°C (EMBRAPA, 2010). Devido ao elevado teor de carboidratos, lípidos (ácidos graxos insaturados) e proteína, o milho é considerado um produto importante para o consumo humano e animal (FAO, 1992; FREITAS *et al*, 2005).

O estado de Rondônia (RO), localizado na região Norte do país, produziu cerca de 651 toneladas de milho em 2014 (BRASIL, 2015). Seu clima predominante é o tropical úmido. A temperatura média anual é de 25°C (19 - 33°C), no entanto, no inverno, pode chegar a menos de 13°C quando ocorrem os fenômenos de friagem (degelo dos Andes - maio a junho). Os meses mais quentes são julho e agosto, com temperaturas entre 33 e 38°C e baixa precipitação de <20 mm / mês (EMBRAPA, 2008).

Como outros cereais, o milho é muitas vezes exposto a contaminação fúngica, começando a sua proliferação no campo, durante o desenvolvimento da planta. A contaminação pode ocorrer devido à presença de fragmentos de micélio e esporos no solo, restos de plantas e sementes ou podem ser transportados pelo vento, chuva ou insetos (MILLS, 1989; SCUSSEL, 2002; HERMANN *et al*, 2006). Durante o armazenamento, os grãos devem ser mantidos em condições adequadas (controle de temperatura, teor de umidade dos grãos - mc -, umidade relativa do ar - UR -, disponibilidade de oxigênio e a presença de

organismos vivos) para evitar danos e infecção por fungos e, conseqüentemente, produção de micotoxinas - contanto que eles sejam de cepas toxigênicas (LAZZARI, 1997; SCUSSEL, 2002; SANTOS, 2002; DALPASQUALE, 2002; PEZZINI, VALDUGA e CANSIANI, 2005; LORINI, 2008).

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos e fungos que produzem toxinas, são principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (AYRES, 1979; CZERVINSKI *et al*, 2007; KAWASHIMA e SOARES, 2006). Várias toxinas são atraídas por determinados órgãos ou tecidos-alvo, sendo o fígado, rins e sistema nervoso mais frequentemente afetados (SANTÚRIO, 2000; IARC, 2002; MAZIERO e BERSOT, 2010). A regulamentação brasileira sobre FBs_{total} de grãos de milho (para processamento), estabelece os níveis máximos toleráveis (LMT) de 5000 µg / kg e será reduzida a 4000 µg / kg em 2017 (BRASIL, 2011a; 2013a).

A ocorrência de micotoxinas em milho e produtos tem sido relatada, especialmente quando se trata de fumonisinas (FBs - FB₁, FB₂), toxina produzida principalmente pelo gênero *Fusarium*, do grupo de campo, especificamente os *F. verticilioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (MARCIA e LAZZARI, 1998; SCAFF e SCUSSEL, 2004; KAWASHIMA e SOARES, 2006; SCUSSEL *et al*, 2011; SAVI *et al*, 2014). A contaminação do milho por *F. verticilioides* normalmente ocorre no campo, com alta umidade, no entanto, também pode ocorrer durante o armazenamento, quando encontram as condições ótimas de umidade (alta) para o desenvolvimento de esporos (FERRARI FILHO, 2011).

A crescente importância dos efeitos patogênicos de micotoxinas em humanos e animais, a partir das matrizes de alimentos, como o milho, são estudados em todo o mundo, inclusive no Brasil, principalmente no Sul, Sudeste e Centro-Oeste (NELSON *et al*, 1983; MILLER, 1995; KEDERA *et al*, 1999; SHEPARD *et al*, 2000; IARC, 2002; AVANTAGGIATO *et al*, 2002; SCAFF, 2003; LINO *et al*, 2004, 2006; WASKIEWICZ *et al*, 2012; CATAO *et al*, 2013; RUBERT *et al*, 2013; SAVI *et al*, 2013; DEGRAEVE *et al*, 2016).

Embora vários estudos tenham relatado pesquisas sobre fungos e contaminação por FBs em diferentes regiões do Brasil, nenhum foi realizado na região Norte, onde as condições ambientais de crescimento fúngico são bastante diferentes. Portanto, este estudo avaliou a qualidade (características físicas e umidade) e sua segurança (fungos e

FBs) de grãos de milho produzidos naquela região, mais especificamente o sul do estado de RO – maior produção.

2. MATERIAL

2.1 Amostras

Grãos de milho seco (total 76) a partir de 4 unidades de armazenadoras de grãos (UAGs) localizados no sul do estado de RO (cidade Vilhena), norte do Brasil, conforme Figura 1. Mc média de 13,20% (9,72-16,30).

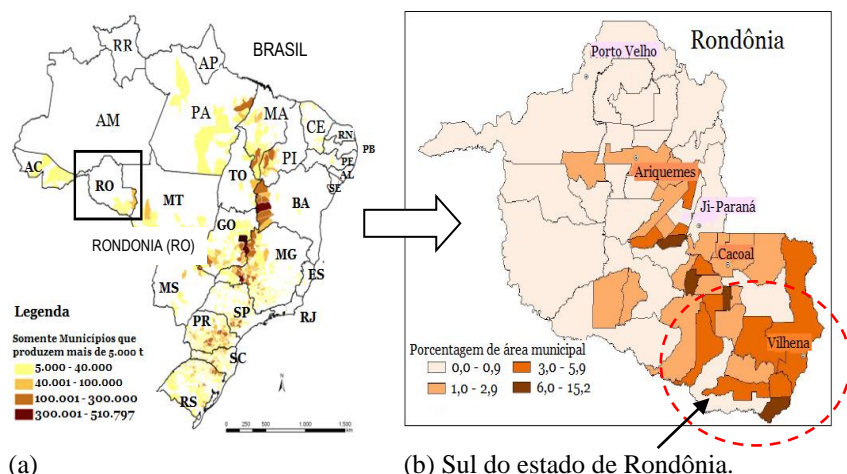


Figura 1. Mapa da produção milho (*Zea mays* L.) no (a) Brasil e (b) estado de Rondônia (BRASIL, 2014 e EMBRAPA, 2008, respectivamente).

2.2 Reagentes, solventes, padrões e meios de cultura

2.2.1 *reagentes* - metanol e ácido acético, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); ortoftalaldeído (OPA), Merck (Jacarepaguá, RJ, Brasil), todos os graus analíticos. 2.2.2 *solventes* - metanol, grau CLAE PANREAC (Barcelona, Espanha); e ultra MilliQ água pura, Millipore (St. Louis, MO, EUA). 2.2.3 *padrões* - FBs (FB₁ e FB₂) da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA); 2.2.4 *meios de cultura* – Agar dextrose de batata (do inglês, *Potato Dextrose Ágar* - PDA - Acumedia /Neogen de Michigan, USA), agar extrato de malte (MEA), peptona bacteriológica (Himedia -

Curitiba, PR, Brasil); Czapek-dox, nitrato glicerol 25% (G25N), Czapek extrato de levedura (CYA) da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); (2.2.5) outros – cloranfenicol e fosfato, da Kyma (Americana, SP, Brasil).

2.3 Equipamentos

Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com circuito injetor 20 μ l, Rheodyne (St. Louis, MO, EUA) e um detector de fluorescência (FLD) todos Gilson (Villiers-le-Bel, França); coluna de fase inversa, C18 (250 mm / 4.6 mm / 5mm de comprimento / diâmetro interno / tamanho de partículas), de Phenomenex (Torrance, EUA); autoclave, Phoenix (Araraquara, SP, Brasil); cabine de segurança biológica, Veco (Campinas, SP, Brasil); cabine bacteriológica, Fanem (São Paulo, SP, Brasil); balança analítica (variação: 0,01-210 g), Ohaus (Parsippany, EUA); moinho de laboratório, Romer (Miami, EUA); bomba de vácuo, Millipore (São Paulo, Brasil); *manifold*, da Phenomenex (Torrance, EUA); Estufa, Quimis (Diadema, SP, Brasil); agitador de tubos, Phoenix (Araraquara, SP, Brasil); bloco de aquecimento, Tecnal (Piracicaba, SP, Brasil); medidor de atividade de água (a_w), Aqualab, Decagon (Pullman, Washington, EUA); homogeneizador, Marconi (São Paulo, Brasil) e divisor de amostras, COMAG (Panambi, RS, Brasil); microscópio óptico, Olympus (CX22, Tóquio, Japão). *Outros materiais*: coluna SAX (SPE) de extração de fase sólida (6 cm^3 , 500 mg), Phenomenex (Torrance, EUA); micro seringa de CLAE (50 μ l), Hamilton (Reno, Nevada, EUA); micro pipetas (100 e 1000 μ l), Kasvi (Xangai, China); dessecadores borosilicato (200 mm \varnothing); cadinhos de porcelana (5 cm \varnothing); placas de petri (vidro e descartáveis); gás nitrogênio, grau analítico, Praxair (Danbury, CT, EUA); sacos de polietileno estéreis (15x20 cm), Seward (Davie, FL, EUA) e de papel de filtro (# 4), Whatman (Maidstone, Inglaterra).

2.4 Outros Materiais

Dessecador, cadinhos de porcelana, cilindro de nitrogênio (White Martins), micro-seringa com agulha fixa, de 50 μ l (Hamilton), frascos de vidro com tampa de polietileno (200 mL), filtro de papel nº 4 Whatman (Maidstone), funil de separação, micropipetas automáticas, de

100 e de 1000 μL (Kasvi), Softwares Pro-Express 4.0 (Windows 95/NT/98).

3. MÉTODOS

3.1 Coleta de amostra

As amostras de grãos de milho (total 76) foram coletadas no município de Vilhena (maior produtor do estado), localizado no sul de RO, região norte do Brasil. A coleta foi realizada no período de julho (safra 2014/1) à dezembro (safra 2014/2) de 2014 nas UAGs (A, B, C e D - capacidade para 6 ton, 2.538 ton, 28,8 ton e 11,1 ton respectivamente), em porções da amostra final de 1 kg, seguindo a metodologia oficial (ANEXO I) estabelecida pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (BRASIL, 2013b) de acordo com o volume presente nos silos. Após a coleta e registro dos dados referentes às amostras, essas foram encaminhadas (refrigeradas) ao laboratório LABMICO da Universidade Federal de Santa Catarina por meio de transportadora.

3.2 Preparo das amostras

Para a classificação de grãos, cada amostra foi homogeneizada com grãos inteiros e porções (250 g) foram separados por quarteada utilizando um divisor de amostras. Para teor de umidade, a_w , de micologia e análise de FBs, a amostra foi moída num moinho de Romer com homogeneização direta e dividido em diferentes segmentos (2, 2, 25 e 50 g, respectivamente).

Foram realizadas as análises de umidade e atividade de água. (3.3.1) *Determinação do conteúdo de umidade*: foi realizada conforme método AOAC (2005a); (3.3.2) *Determinação da atividade de água*: foi obtida através da medição de uma porção de 2 g de cada amostra em aparelho Aqualab 4 TE Series com temperatura de 25° C (DECAGON, 2001).

3.4 Classificação

A qualidade de grãos de milho, em relação proporções de grãos sadios, grãos alterados e matérias estranhas foram avaliados por triagem,

de acordo com os critérios de classificação de grãos de milho do Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 2011b). Cada porção de grãos preparadas (pelo método de quarteamento) foi visualmente separada por suas alterações físicas e biológicas causada por organismos vivos (grãos mofados, fermentados, ardidos, carunchados) e / ou físico / biológico (quebrado <5 e >3 mm, imaturo, gessado). IMPUREZAS - a partir de milho (restos de plantas, quebrado <3 mm) e / ou em outros (grãos diferentes, macro / detritos, solo, poeira, insetos mortos, outras plantas). Além disso, o nível de umidade (seção anterior) foi definida. As amostras de milho foram então capazes de ser classificados por tipo - I, II, III e fora de tipo (Anexo II).

3.5 Análises micológicas

Foram realizadas (3.5.1) *Contagem total de fungos*: as amostras de milho (25 g) foram assepticamente transferidas para sacos de polietileno e adicionadas de água peptonada 0,1% (225 ml), seguido de homogeneização. De cada amostra diluída (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) um volume de 100 μ l foi inoculado (com auxílio da alça de drigalski) sobre a superfície do meio PDA contendo cloranfenicol (100 mg/l) em capela de fluxo laminar (n=2). As placas foram incubadas em estufa microbiológica à 25°C \pm 1°C por um período de até 7 dias (Silva *et al*, 2013; APHA, 2015). Após este período, as colônias desenvolvidas no meio de cultura foram enumeradas utilizando contador de colônias e expressas em unidade formadora de colônia por g (UFC / g). (3.5.2) *Isolamento das colônias fúngicas*: as colônias de fungos filamentosos que cresceram no meio PDA, foram repicadas assepticamente para os meios MEA, G25N e CYA e incubadas por 7 dias à 25°C \pm 1°C. Após o crescimento, as características das colônias foram observadas macroscopicamente e registradas para o auxílio na identificação dos gêneros e espécies fúngicas (RAPER; FENNELL, 1965, PITT, 1979 e BARNETT; HUNTER, 1986). (3.5.3) *Identificação dos gêneros e espécies fúngicas*: a técnica de microcultivo foi realizada em placa de Petri estéril, onde foi adicionado um suporte de vidro contendo uma lâmina. Na parte superior desta lâmina, foi acondicionado 5 cm do meio de cultura sólido Czapek-doc. Neste meio foi acrescentado cubos de aproximadamente 1 mm de cada colônia crescida com auxílio de agulha estéril, e colocado uma lamínula sobre as colônias. No interior da placa, foi acrescentado um pedaço de algodão contendo água destilada estéril para manter a umidade e em seguida as placas foram fechadas e

incubadas por 5 dias à 25°C \pm 1°C. Após este período, a lamínula contendo parte do crescimento das colônias fúngicas foi retirada e transferida para uma lâmina contendo uma gota de corante lactofenol azul de algodão. As lâminas coradas foram visualizadas em microscópio óptico em aumento de 100 e 400 vezes. A partir da observação das características macroscópicas e microscópicas, as identificações dos gêneros e espécies fúngicas foram realizadas de acordo com as chaves de identificação de RAPER; FENNELL (1965), PITT (1979) e BARNETT; HUNTER (1986).

3.6 Determinação de micotoxinas

Foram realizadas análises para fumonisinas (FB₁ e FB₂) nas amostras de milho, por cromatografia líquida com detecção por fluorescência de acordo com o método oficial internacional (AOAC, 2005b). As etapas envolvidas são - extração por solvente, limpeza, determinação e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (3.6.1) *extração por solvente*: foram liquidificados 50 gramas da amostra com a solução de metanol P.A (80 mL) durante dois minutos, logo após foi filtrada (filtro de papel) com a separação do sobrenadante. (3.6.2) *Limpeza*: Colunas sax deverão ser condicionadas com metanol puro (5 mL) e posterior solução metanol:água (80:20 - 5 mL). Então o extrato (10 mL) foi injetado nas colunas acopladas à bomba vácuo, onde a velocidade deverá ser controlada (1 mL / minuto). As colunas então foram lavadas com a solução metanol:água (80:20 - 5 mL) e metanol (MeOH) puro (3 mL). O líquido foi eluído sob ação da gravidade com a solução de metanol:ácido acético (99:1 - 10 mL). (f.3) *Determinação*: secagem eluato com uso de nitrogênio (60 °C). Redissolução com de MeOH CLAE (1 mL) misturado, para secar novamente com uso de nitrogênio (*clean up* do extrato). Logo após, o material foi derivatizado (Derivatização OPA), onde o extrato foi redissolvido com MeOH (200 µL) homogeneizado com uso do vórtex. Extraíndo 25 µL desta solução, acrescentar oftaldeído (OPA - 225 µL). (3.6.4) *análise por CLAE*, com aplicação no CLAE (20 µL), utilizando detector de fluorescência, coluna C18 (fase reversa), utilizando a fase móvel metanol com tampão fosfato (77:23). Após a leitura, a análise dos resultados foi realizada (AOAC, 2005b - 98515). O método aplicado para determinação de FBs no CLAE foi validado no laboratório para milho em grãos, com todos os critérios necessários (linearidade,

seletividade, repetibilidade, reprodutibilidade, LOD, LOQ e recuperação).

3.8 Condições do clima

Foram observados dados edafoclimáticos do período correspondente à coleta de amostras, quanto ao índice pluviométrico, umidade relativa (UR) e temperatura, através do site do Instituto Nacional de Pesquisa Espacial (INPE), afim de verificar a possibilidade de sua influência sobre os resultados.

3.9 Expressão dos resultados

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão uma vez que em todas as análises apresentaram muitas variáveis, impossibilitando a aplicação em modelos estatísticos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados obtidos sobre grãos de milho produzidos e armazenados em quatro UAGs de Vilhena, no estado de RO (região Norte do Brasil), observou-se que tanto a sua qualidade (danos de grãos / impurezas / umidade) e de segurança (fungos / FBs) apresentam variações, como pode ser observado abaixo.

4.1 Qualidade do milho

Os dados de qualidade de amostras de grãos de milho, obtidos a partir da 4 UAGs (A, B, C e D), com as suas diferenças, quanto percentagem de danos, de impurezas e de umidade (teor de umidade & a_w), incluindo a sua classificação são apresentados na Tabela 1.

4.1.1 Danos e impurezas dos grãos de milho armazenado

DANOS - observou-se uma elevada percentagem de grãos mofados, fermentados e corados principalmente sobre aqueles armazenados em UAG-C, seguido de -D. A melhor qualidade em relação mofados / mancha e insetos eram de UAG-A e -B.

IMPUREZAS - por outro lado, as impurezas (solo, insetos mortos, grãos diferentes) também estavam presentes principalmente nas

amostras armazenadas no UAG-C (0,22%), seguido por -A, -D e -B (com 0,06, 0,05 e 0,03% respectivamente).

TIPOS DE GRÃO - Quanto aos tipos de grãos contra as alterações de grãos, a maioria dos grãos foram classificados como tipo I, com exceção para a presença de insetos (besouros / larvas), isto é, grãos *fora de tipo* (amostras de UAG-C). Nesse caso, é recomendável submeter todo o silo de grãos à fumigação. O Tipo II é classificado de acordo com a quantidade de grãos e danos fermentados. A inclusão de amostras de culturas 2014/1, que permaneceram mais tempo armazenado (> 4 meses) e foram recolhidas imediatamente antes da colheita 2014/2 (Tabela 1), contribuiu para a classificação Tipo II. Somente uma amostra (de 2014/1 safra) continha níveis elevados de grãos mofados (10,90%) que foi recomendado para descarte. O foco principal da análise de grãos danificados foi correlacioná-las com os resultados do estudo em curso sobre fungos (isolados) e a toxina detectada (FBs). Além disso, para correlacionar a sua qualidade através da observação da presença de organismos vivos (insetos / fungos) e de grãos alterados (fungos e bactérias de fermentação).

Tabela 1. Qualidade de grãos em relação a danos, impurezas e umidade do milho (*Zea miz L.*) produzidas e armazenadas no estado de Rondônia, norte do Brasil

Alterações em lotes de grãos e umidade		Qualidade do milho (%) e Tipo * / ** UAGs					
		A			B		
		Média(%)	Tipo	Média(%)	Tipo	Média(%)	Tipo
DANOS							
<i>Organismos vivos</i>							
Mofados		ND	I	0.4	I	10.9	Fora T. 0.3 II
Fermentados		1.4	I	3.5	I	30.0	Fora T. 8.6 II
Carunchados		0.4	I	0.1	I	5.0	Fora T. 0.1 II
<i>Físico / biológico</i>							
Quebrados (<5>3mm ^a)		1.9	I	0.2	I	0.51	Fora T. 0.2 II
Gessados		0.8	I	0.2	I	0.39	Fora T. 0.4 II
Brotados		ND	I	ND	I	ND	Fora T. ND II
Imaturos		0.4	I	0.2	I	0.67	Fora T. 0.6 II
IMPUREZAS							
Quebrados (<3mm ^a)		0.66	I	0.08	I	2.0	Fora T. 0.4 II
Queimados ^b		0.01	I	0.04	I	0.3	Fora T. 0.3 II
Outros grãos(<5&<3mm ^a)		ND	NA	ND	I	ND	Fora T. ND II
Matéria estranha	Macro ^c	0.02	I	0.02	I	0.07	Fora T. 0.03 II
Insetos mortos		0.03	I	0.01	I	0.10	Fora T. ND II
Outras plantas / sementes		0.01	I	ND	I	0.05	Fora T. 0.02 II
UMIDADE							
mc		13.9	NA	13.4	NA	14.5	NA 13.2 NA
a _w		0.64	NA	0.66	NA	0.71	NA 0.62 NA

^a tamanho de diâmetro da peneira; ^b durante a secagem a alta T °C; ^c visto através do olho nu (risco para a saúde humana). *Tipos I, II, III e Fora de Tipo: até 6, 10, 15 e 20 de dano% (até 5% de grãos quebrados e / ou a presença de insetos – Fora de Tipo), respectivamente. NA: Não aplicável; ND: não detectado; mc: teor de umidade; a_w: atividade de água; ** Unidade de armazenadora de grãos

4.1.2 Condições de umidade do milho

Os grãos de milho secos armazenados tiveram sua umidade variando 10,34-16,29% (média de 13,20%) e a_w 0,52-0,80 (média de 0,62) durante o período do estudo. Em relação às condições para o crescimento de fungos de campo toxigênicos, os dados mostram que a maioria deles eram seguros. No entanto, apenas uma amostra atingiu umidade do grão de 16,29%, o que permitiria o desenvolvimento de armazenamento fungos. Para os fungos de campo *F. verticillioides*, possui condições ótimas de crescimento e produção de FBs no milho quando a umidade do grão atinge de 20 a 21% (WATSON e RAMSTAD, 1987; BERND, 2014) e a_w de 0,95-0,98, à temperatura de 25 a 30 °C (MARÍN *et al* , 1995, 1999a, b). As primeiras amostras coletadas (em julho) tiveram uma variação de umidade contida nos grãos entre 12,13 - 16,29%, o que pode ser explicado pela estação das chuvas (> UR) no período. Outra razão para esse aumento umidade do grão, foi o tempo de armazenamento (> 4 meses) nos silos à espera de melhor preço de mercado (fora de época), o que poderia ter levado à redução da qualidade dos grãos.

4.2 – Segurança do milho

Além do isolamento de fungos de campo e sua produção de FBs, foi também possível avaliar a carga de esporos de fungos, seus gêneros e identificação de espécies, incluindo os de armazenamento, o que poderia dar uma melhor visão das condições de segurança do milho. Os dados obtidos a partir de UFC, isolamento de fungos gêneros e identificação das espécies estão apresentados na Tabela 2 e 3.

4.2.1 Fungos

FUNGOS - no que diz respeito à carga fúngica, oito amostras não apresentaram crescimento, no entanto, como esperado, esporos de fungos estavam presentes em 91% das amostras e foram capazes de crescer sobre os meios inoculados (PDA), nas condições ótimas (25 °C) oferecidos, permitindo quantificar a extensão da carga de fungos do milho, com mínima detectada de $1,0 \times 10^1$ e máxima de $3,0 \times 10^3$ UFC/g, dentre as quais, nove amostras (12%) encontram-se na faixa de $1,0 \times 10^1$ e $7,0 \times 10^1$ UFC/g, 33 amostras entre $1,1 \times 10^2$ e $9,4 \times 10^2$ UFC/g e 26 (35%) entre $1,1 \times 10^3$ e $3,0 \times 10^3$ UFC/g. No Brasil, a legislação não prevê

limites máximos toleráveis (LMT) para fungos para grão de milho seco, apenas para a farinha de milho, $<1 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001). Após o crescimento das colônias, foram identificados um total de 5 gêneros, com posterior isolamento e identificação de 16 espécies de fungos (conforme tabela 2), isolados a partir das 76 amostras (RO) de milho seco. Em relação gêneros isolados, a maior incidência registrada foi de *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* e *Penicillium*.

FUSARIUM - apesar dos gêneros de armazenamento isolados, que se poderia esperar (requer menor m_c e a_w), o principal gênero isolado foi o *Fusarium* que exige alto teor de umidade e a_w (20 - 25% e 0,80 - 0,95, respectivamente) para o seu crescimento (SCUSSEL, 1998; REIS, 2014). Este gênero, cresce principalmente no campo quando os esporos estão ainda na planta / grãos e podem produzir várias micotoxinas, sendo a mais importante as FBs (FB₁, FB₂, FB₃) tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T2) e zearalenona (CRUZ, 2010; FILHO, 2011; SCUSSEL et al, 2011). Considerando que uma elevada porcentagem das amostras de milho incluíam o gênero *Fusarium* (total 73,7%), especilamente a espécie toxigênica *F. verticillioides*, concluí-se que encontraram condições adequadas para o crescimento e produção de FBs, no campo ainda na planta ou durante a colheita, uma vez que a umidade durante o armazenamento não é favorável, após a etapa de secagem dos grãos e controle de umidade nos silos. *Fusarium* também foi detectada em grãos de milho por outros autores, embora a partir do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (MÁRCIA e LAZZARI, 1998; CRUZ, 2010; BENTO, 2011; FERREIRA et al, 2013; SAVI et al, 2014; REIS, 2014). No presente estudo, foi observado ainda uma ocorrência combinada (36,8%) de gêneros de campo com outros gêneros por amostra, como *Fusarium* com *Aspergillus* e também com *Penicillium*, assim como apenas a ocorrência de *Aspergillus* e *Penicillium* combinados. Márcia e Lazzari (1998) analisaram grãos de milho (81) e seus produtos provenientes do sul do Brasil, sendo o gênero *Fusarium* detectado na maioria das amostras (97,5%), com predominância de *F. verticillioides*. Em outro trabalho do estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil (safras 2009/2010), também foi registrada a ocorrência de fungos em grãos de milho (Bento et al, 2012), os autores relataram a mesma predominância do gênero *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* e *Penicillium*.

Tabela 2. Gêneros de fungos e espécies isoladas a partir de grãos de milho secos armazenados no estado de Rondônia, Brasil*

Fungos		Números de amostras contaminadas	Isolamento de fungos (%) ^a	
Grupo	Gênero			Espécies
CAMPO				
<i>Fusarium</i>		<i>F. verticillioides</i>	56	73.7
		<i>F. graminearum</i>	11	14.5
		<i>F. poae</i>	8	10.5
		<i>F. oxysporum</i>	5	6.5
<i>Cladosporium</i>		NI ^b	1	1.3
	<i>Mucor</i>	NI	2	2.6
ARMAZENAGEM				
<i>Aspergillus</i>		<i>A. flavus</i>	8	10.5
		<i>A. ibericus</i>	6	8.0
		<i>A. section nigri</i>	5	6.5
		<i>A. piperes</i>	4	5.3
		<i>A. flavipes</i>	4	5.3
<i>Penicillium</i>		<i>A. terreus</i>	3	4.0
		<i>Penicillium</i> sp.	5	6.5
		<i>P. chrysogenum</i>	5	6.5
		<i>P. purpurogenum</i>	3	4.0
		<i>P. brevicompactum</i>	1	1.3

^a porcentagem de fungos isolados das amostras (n = 76); ^b não identificados. *(julho à novembro, 2014)

ESPOROS - esporos quando presentes em grãos armazenados, devido a uma contaminação ainda no campo ou no transporte, ao encontrar condições ótimas, pode crescer em colônias de fungos que deterioram o grão, tanto antes como durante o armazenamento. Vários autores relatam as condições de armazenamento não controladas (alta variação da temperatura e umidade do grão) que podem permitir a proliferação de esporos de *Fusarium* em grãos armazenados. No entanto, enquanto houver o controle de temperatura, umidade e de vetore (iseto e pragas) durante o armazenamento, os esporos não se desenvolverão no alimento.

4.2.2 *Fumonisin*s

MÉTODO DE VALIDAÇÃO - de acordo com a validação do método analítico, as curvas de calibração foram lineares de 0,0002 a 0,05 g/ml concentrações com coeficientes de correlação de 0,994 e 0,996 para FB₁ e FB₂, respectivamente. Os limites de detecção (LOD) foram de 2,5 e 6 µg/kg e de quantificação (LOQ) de 12,5 e 31,3 µg/kg para ambos FB₁ e FB₂, respectivamente. Recuperações médias em amostras de milho foram 70, 85 e 90% para as concentrações de 50, 250 e 5000 µg/kg para ambos os compostos.

NÍVEIS – Em relação aos níveis de FBs detectados no milho pesquisado proveniente de RO (Tabela 3), 40 amostras correspondentes a 52,6% do total pesquisado apresentaram contaminação por ambas as toxinas (FB_{total}). No entanto, apenas 47,40% estavam acima do limite de quantificação, aqueles que devem ser considerados como dados validados. Os níveis detectados variaram entre 64,0 e 3.060,5 µg/kg. Os valores médios para FB₁, FB₂ e FB_{total} nas amostras positivas foram de 644,9, 532,8 e 1.221,6 µg/kg, respectivamente estando abaixo do LMT brasileiro (FB_{total}: 5.000 µg/kg), inclusive abaixo do valor preconizado pelo *Food and Drug Administration* - FDA (US - 4000 µg/kg) (BRASIL, 2011, 2013; FDA, 2001). Portanto, dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação do país e apenas 9,21% (n = 7) estão acima da UE (1000 µg/kg) para consumo humano (CE, 2007).

Os níveis de FBs (Tabela 3) que tiveram mais amostras positivas registradas foram 101 - 200 e 201 - 400 µg / kg com 10 e 11 amostras, respectivamente, muito abaixo do LMT. Observou-se que os valores mais elevados FBs detectado (2039,00; 2657,38; 2979,98; 3060,50 e 3302,60 µg / Kg) nas amostras de milho não se correlacionou

com a alta umidade do grão (min 11,9%, média de 12,63% e máximo 12,8%) necessário para os fungos de campo. Portanto, a contaminação por *Fusarium* e produção da toxina ocorreu antes do processo de secagem de grãos e do período de armazenamento (UAGs).

Table 3. Níveis de fumonisinas encontradas em milho seco do Sul do estado de Rondônia *versus* LMTs do Brasil, Estados Unidos e União Européia

Faixa (µg/kg)	Positivas	Parâmetros	Níveis (µg/kg) ^b		Frequência (%)	>LMT ^c (µg/kg)	
			FB ₁	FB ₂		BR ^d (5000)	EU ^f (1000)
32-100	6	Média	46,9	42,5	7,9	<	<
		D.P. ^g	8,2	13,8			
		D.P.R.(%) ^h	2,9	3,7	3,9		
101-200	10	Média	72,0	64,1	13,0	<	<
		D.P.	23,9	19,8	28,4		
		D.P.R.(%)	4,9	4,5	5,3		
201-400	11	Média	136,0	140,4	14,5	<	<
		D.P.	59,3	48,2	57,1		
		D.P.R.(%)	7,7	6,9	7,6		
401-600	1	Média	429,3	215,7	1,4	<	<
		D.P.	NA	NA	NA		
		D.P.R.(%)	NA	NA	NA		
601-1000	5	Média	321,3	482,6	6,6	<	<
		D.P.	249,1	175,3	142,0		
		D.P.R.(%)	15,8	13,2	11,9		
1001-2000	1	Média	1241,5	313,2	1,4	<	>
		D.P.	NA	NA	NA		
		D.P.R.(%)	NA	NA	NA		
2001-2500	2	Média	1093,0	934,0	2,6	<	>
		D.P.	NA	NA	NA		
		D.P.R.(%)	NA	NA	NA		

Faixa (µg/kg)	Positivas	Parâmetros	Níveis (µg/kg) ^b		Total	Frequência			
			FB ₁	FB ₂		BR ^d (5000)	US ^e (4000)	EU ^f (1000)	
2501-3000	2	Média	1621,8	1192,4	2814,2	2,6	<	<	>
		D.P.	NA	NA	NA				
		D.P.R.(%)	NA	NA	NA				
3001-3500	2	Média	1987,0	1194,6	3181,5	2,6	<	<	>
		D.P.	NA	NA	NA				
		D.P.R.(%)	NA	NA	NA				
Total positivas: 40						51,3			

^a Fumonisinás; ^b limite de quantificação (12,5 e 31,3 µg/kg para FB₁ e FB₂, respectivamente); ^c limites máximos toleráveis; ^d Brasil; ^e Estados Unidos da América; ^f União Européia; ^g desvio padrão; ^h desvio padrão relativo (%). ND - não detectado; NA – Não aplicado. *(julho à novembro de 2014)

Outro fator importante é que 50% dos valores elevados de FBs foram detectados em milho para a alimentação animal (de UAG-C). Em relação à dados que se referem sobre milho e FBs para alimentação animal, um estudo realizado por Cruz (2010) em Pirassununga (SP) com milho para a produção de alimentos destinados à animais, os níveis detectados foram de 431 a 6.495 µg/kg, sendo bem acima dos valores encontrados em amostras de milho RO. O Comitê de Micotoxinas da Associação Americana de Veterinários diagnóstico laboratorial estabelece as LMTs entre 5.000 e 50.000 µg/kg (FB₁ + FB₂ + FB₃) em milho para a alimentação de cavalos, porcos, gado e aves (BENTO, 2014). Portanto, mesmo o exemplo de má qualidade, indicado para descarte, continha nível de contaminação (FBs) menor do que o LMT inferior aceito para a alimentação de espécies animais acima descritos.

4.3 Condições climáticas versus *Fusarium* e toxinas

A contaminação de produtos agrícolas por fungos de campo e FBs depende de diferentes fatores, além da região geográfica (onde são cultivadas) e as estações de plantio / colheita, também as condições climáticas (temperatura, precipitação de chuva e umidade relativa - UR). Como grãos no Brasil são cultivadas principalmente em regiões subtropicais, foram relatados como propensos à contaminação de FBs (Henry e Wyatt, 1993). A Figura 2 mostra dados sobre temperatura, precipitação e UR da região onde os grãos de milho estavam armazenados no estado de RO.

PRECIPITAÇÃO - de acordo com os dados coletados, as condições climáticas (Figura 2) da região estudada eram propensas ao crescimento de fungos, especialmente durante os principais meses chuvosos (outubro a novembro). Atingindo variação mensal 12,83 - 20,00 mm durante o período. Aumentando assim UR do ambiente, que foi a época da colheita de grãos.

TEMPERATURA – Do período do plantio até o armazenamento em UAGs (na coleta de amostras) eram marcados por altas temperaturas, ou seja, a partir de 29,52 até 32,84°C. Na verdade, não há possibilidade de controlar as variações de temperatura ambiente durante o plantio, no entanto, é possível e fundamental para controlá-lo durante o armazenamento, reduzindo a probabilidade de crescimento de fungos e ataque de insetos. Especialmente, porque a temperatura na região pode variar de tão elevada (32°C) na luz do dia, como uma baixa (19°C) durante a noite, levando os fungos a um *stress* e provocando a produção

da toxina, quando existir a presença de fungos toxigênicos. Por isso, a aplicação de boas práticas agrícolas, secagem de grãos e armazenamento adequado são de extrema importância, a fim de reduzir o seu efeito sobre a qualidade e segurança de grãos.

UMIDADE RELATIVA - durante a maior parte do período do estudo, a UR era ótima para diferentes fungos crescerem, entre 69,35 - 92,44%, com média de 81,58%. Somente no mês de agosto, houve redução (sendo menos favorável para o desenvolvimento de fungos). De acordo com Taniwaki e Silva (2001), a UR para fungos de armazenamento crescerem é de 70% e o ideal é de 80 - 85%. As condições de UR e teor de umidade dos grãos permitem que as populações fúngicas tenham um ótimo crescimento à 25°C. Observa-se que a umidade ligeiramente acima (na recepção das UAGs), já predispõe ao desenvolvimento de fungos (RODRIGUEZ, *et al.*, 2004). As regiões dominadas por clima tropical úmido permitem a produção agrícola do milho ao longo do ano, devido às condições favoráveis. No entanto, essas condições climáticas semelhantes (alta umidade e temperatura) podem favorecer o desenvolvimento de fungos em grãos, da colheita e durante o armazenamento, devido à vulnerabilidade de milho ao ataque de pragas e contaminação por fungos (COSTA e ZANELLA, 2012), o mesmo não foi observado em altas medidas nas amostras pesquisadas do atual estudo.

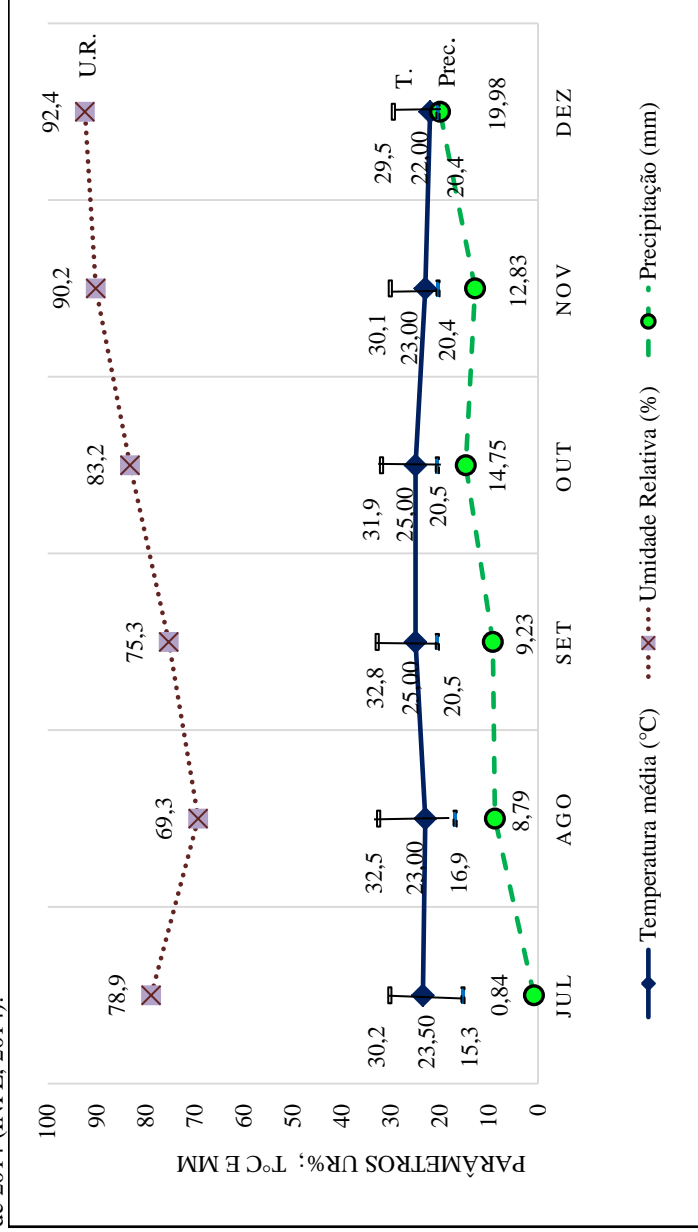
4.4 Danos, fungos, umidade e as condições climáticas

A alteração mais significativa nos grãos de milho avaliados foi a fermentação, sendo de 8,6; 3,5; 1,4 e 30% das amostras das UAGs -A, -B, -C e -D, respectivamente. Isto indica que houve ação de fungos / bactérias durante a armazenagem levando a fermentação. Os grãos de milho mofados foram detectados nas amostras coletadas da 1ª safra (2014/1), depois de uma temporada atípica de chuvas na região, o que corroborou para a contaminação de fungos no campo. Além disso, o longo período armazenado (abril a julho), até quando eles foram coletados (grãos de milho de baixa qualidade).

Essas amostras coletadas em julho (safra 2014/1), continham maior teor de umidade (14,5%) e a_w (0,71%) (Tabela 1). Essas condições permitiram o ataque de insetos e crescimento de fungos (esporos do campo) e também carregados por insetos de armazenamento encontrados nos grãos. A literatura correlaciona insetos como portadores de fungos (BIRCK, 2005; BENTO *et al.*, 2012; PHOKU *et al.*, 2016).

Na safra 2014/2, o clima durante o plantio e colheita (temperatura, precipitação e UR) foi favorável para a produção de milho, a safra apresentou o maior número de grãos, como Tipo I, de boa qualidade.

Figura 2. Condições Climáticas do município de Vilhena, Sul do estado de Rondônia, Brasil - no período de julho à novembro de 2014 (INPE, 2014).



5. CONCLUSÃO

A umidade (teor de umidade e a_w) dos grãos estava dentro do permitido por lei, e as primeiras amostras (coletadas após o período regular de comercialização da safra 2014/1, em julho), apresentaram umidade entre 12,05 - 16,30%, resultando em qualidade reduzida dos grãos, uma vez que foi mantida nos silos por 4 meses (período de entre-safra). Como esperado, os principais gêneros de fungos isolados contaminando os grãos de milho seco do sul do estado de RO foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Quanto a contagem total de fungos, 65% das amostras estavam abaixo do limite máximo para farinha de milho, após seu processamento, contudo, não há legislação para o milho em grão, e parte dos grãos de menor qualidade são destinados à alimentação animal. Em relação às FBs, foram detectadas nos grãos, em níveis baixos. Várias amostras (44,7%) estavam contaminadas com níveis mínimos de FBs (entre 1,0 e 40,0 $\mu\text{g/kg}$), e inferior a LOQ, a grande maioria com ótima qualidade. Os dados das condições climáticas, juntamente com a análise mostraram que, apesar de ser uma região quente e úmida, a área do sul do estado de RO, tem boas condições para a produção e armazenagem segura de milho, sendo a maior parte de grãos sadios, de tipo I com boa qualidade, desde que mantenham os cuidados necessários antes e durante o armazenamento, evitando grandes perdas econômicas e, principalmente, visando à saúde dos consumidores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, Métodos oficiais de análise da AOAC International. **AOAC 978,18 - Atividade água de vegetais enlatados**, 2005a. Disponível em: <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp? ID = 18355>> Acess: 25/01/2016.

AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International. Natural toxins*. 18th Edition. Gaithersburg, USA, 2005b.

AVANTAGGIATO, G.; QUARANTA, F.; DESIDERIO, E.; VISCONTI, A. *Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by Sesamia*. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.83, p.13-18, 2002.

APHA - American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbio-logical Examination of Foods*. 5ª edição. Ed: SALFINGER, Y. e TORTORELLO, M. L. *APHA press*: 2015.

AYRES, J. C. *Significatince of food mycology – an overview*. In: Food mycology, Rhodes, M.E. Ed, G. K. Hall & Co., Massachusetts, p. 3-10, 1979.

BENTO, Larissa F. *Physical and sanitary quality of corn grain stored in Mato Grosso Master's thesis in Tropical Agronomy*. Federal University of Mato Grosso, Cuiaba, MT. 71p, 2011.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. de F.; KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. de J. *Occurrence of fungi and aflatoxins in maize kernels*. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo, 71, no. 1: p.41-49, 2012.

BERND, L. P., SOUZA, T. M., OLIVEIRA, M. A. DE, ONO, E. Y. S., ZUCARELI, C. & HIROOKA, E. Y. *Inoculation of Pseudomonas fluorescens and NPK fertilization on chemical composition and contamination fungus-fumonisin corn*. R. Bras. Eng. Agríc. Environmental, 18, n.12: p.1274–1280, 2014.

BIRCK, N. M. M. *Fungal contamination, mycotoxins and their relationship with the insect infestation in stored wheat*. Thesis (MS) in Food Sciences, Federal University of Santa Catarina. 146 p, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada de Administração RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n - 7, de 18 de fevereiro de 2011 - os teores máximos autorizados (MTL) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial, p. 66-67, 2011(a).

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011(b)**.

Disponível em: <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=78895>>
Acesso em: 2014/07/24.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013(a)**. Diário Oficial da União, p.756, 2013. Disponível em: <<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/170909/ANVISAprorroga-Prazopara-Limites-maximosdemic-otoxinas-em-Alimentos>> Acesso em: 2014/07/28.

BRASIL, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Dados históricos 31999 - Vilhena, 01/julho/ 20014 a 31/Dez/2014**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasil, 2014. Available in: <<http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/historico/passo2.php?id=31999>> Access: 03/Jan/ 2015.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhando a colheita brasileira de grãos, v. 2 - safra 2014/15, n. 11 – 11º levantamento, agosto, 2015**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/Arquivos/15_08_18_10_30_18_boletim_graos_agosto_2015.pdf> Acesso em: 2015/11/11.

CATÃO, Hugo C. R. H.; MAGALHÃES, Helida M.; SALES, Nilza de L. P.; BRANDÃO Jr., Delacyr da S. e ROCHA, Fernando da S. **Incidência e viabilidade das sementes crioulas de milho naturalmente infestado com fungos em pré e pós-armazenamento**. Ciência Rural, Santa Maria, 43, n.5: p.764-770, 2013.

COSTA, José A. A .; ZANELLA Gisele N. **A identificação de fungos filamentosos em derivados de milho negociados em Primavera do Leste - MT**. Rev. Bras. Fazenda. 93 (1): 109-113, 2012. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-1-17.pdf>> Access: 2014/01/08.

CRUZ, J. V. de S., 2010. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente em alimentos para animais de estimação, comercializados na região de Pirassununga, São Paulo**. 73f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

CZERVINSKI, T.; MONTEIRO, M. C.; PITTINER, E.; SHANCHES, H.F. **Isolamento de fungos em alguns produtos derivados de milho.** Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde. 13 (1/2): 21-27, 2007.

DePasquale, V.A. **Modelo matemático para a refrigeração dos produtos agrícolas de simulação em contra-fluxo.** Acta Scientiarum, Maringá, PR, 24, n.5: p.1213-1217, 2002.

DECAGON, Devices Inc. **Medidor de Atividade de Água: manual do operador.** 3. ed.:185 p, Pulman, WA:. Decagon, 2001.

DEGRAEVE, S.; MADEGE, R.R.; AUDENAERT, K.; KAMALA, ORTIZ, A J.; KIMANYA, M.; TIISEKWA, B.; MEULENAER, B. de; HAESAERT, G. *Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of Fusarium species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania.* Food Control 59: 225 – 233, 2016.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **GODINHO. Sistema de produção V. P. C. para a cultura do milho em Rondônia.** 3ª Ed Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 46 p, 2008. (Sistemas de Produção / Embrapa RO, 0113-1668; 32).

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O cultivo de milho.** Sistema de Produção, ISSN 1679-012X 1. Versão eletrônica - 6ª edição, 2010. Conjunto. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_milho.htm ed / gestão> Acesso em: 2014/07/09.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações de boas práticas de armazenamento milho para a agricultura familiar.** In: Técnico Circular 161, novembro de Sete Lagoas, Minas Gerais, 2011.

EUROPEAN COMMISSION. *Regulation (EC) No. 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products.* Off. J. Eur. Union. L. 255:14–17, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. ***Maize in human nutrition***. FAO Food and Nutrition Series, n. 25. ISBN 92-5-103013-8. Rome, 1992. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E00.htm#Contents>> Acesso:11/01/2016.

FDA, Food and Drug Administration. ***Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance. Contains Nonbinding Recommendations***. June 6, 2000; Revised November 9, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminants/Minerals/Toxins/Pesticides/ucm109231.htm>> Acesso em: 26/01/2016.

FERRARI FILHO, E. Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade microbiológica do grão de milho no armazenamento físico-químico e. A tese de mestrado em ciência da planta, Faculdade de Agronomia da UFRGS, fevereiro, Porto Alegre, RS, 2011.

FERREIRA, Priscila; QUEIROZ, Valeria A. V.; Conceição, Renata R. P.; MIGUEL, Rafael de A. ***Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais***. Journal of Milho e Sorgo, 12, n.1: p. 54-60, 2013.

FILHO, F. C. C. ***Monitoramento fungos toxigênicos e aflatoxinas em alimentos para animais utilizados na piscicultura em Teresina, Piauí, Brasil***. Tese de Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí, 43 p, 2011.

FREITAS, E.R.; SAKOMURA, N.K., NEME, R.; BARBOSA, N.A.A. ***Valor nutricional do milho termicamente processados, utilizados na alimentação dos pré-inicial para frangos de corte***. Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec, 57: n.4, p.510-517, 2005.

HENRY, M.H.; WYATT, R.D. ***A review of fumonisins production by Fusarium moniliforme and fumonisins toxics is in animals***. Journal of Applied Poultry Research, 2: p.188-192, 1993.

HERMANN, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E.; NOLL, I. B. ***Fungi and fumonisins in pre-maize harvest period. Science magazine.*** Food Technology, Campinas, 26 (1): 7-10 Jan, 2006. .

IARC - International Agency For Research On Cancer. ***IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.*** Volume 82: 301-366. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC, Lyon France, 2002.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, V.M.V. **Effect of fumonisins B1, aflatoxin B1, B2, G1 and G2, zearalenone, ochratoxin in maize products.** Food Science and Technology, 26: p.516-521, 2006.

KEDERA, C.J., PLATTNER, R.D. e DESJARDIN, A.E. **Incidence of *Fusarium spp.* and levels of fumonisin B1 in maize in western Kenya.** Appl. Environ. Microbiol., 65 (1): 41-44, 1999.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e alimentos para animais.** 2nd ed. Curitiba: Ed Autor, 148p.,1997.

LINO, E.; SILVA, L.J.G.; PEN, A. S. **As fumonisinas: presença nos alimentos, implicações para a saúde e os aspectos legislativos.** Jornal Português de Medicina Veterinária, RPM 99 (552) 181-192, 2004.

LINO, E.; SILVA, L.J.G.; PEN, A. S. **Metodologias de análise para determinação de fumonisinas em milho e alimentos à base de milho.** Revista Chemical News, 2: p.293-299, 2006.

LOPEZ-OVEJERO, R. F. Christofolletti, P. J.; NICOLAI, M.; BARELA, J. F. **Manejo de plantas daninhas na cultura do milho.** In: FANCELLI, A. G.; DOURADO-NETO, D. (Eds). Milho: Estratégias de manejo para alta produtividade. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Departamento da produção vegetal, p.47-79, 2003.

LORINI, I. **A gestão integrada dos insetos em armazenagem de grãos de cereais.** Ed. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 1: 72p., 2008.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle de pragas de milho durante o armazenamento**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normativas Instrução nº 60 de 22 de dezembro, 2011**. Disponível em: <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=78895>> Acesso em: 24/07/2014.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de colheita de amostra de controle manual de resíduos e contaminantes em produtos de origem vegetal**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agricultura Departamento de Defesa - Brasília: MAP / ACS, p 37, 2013.

MARCIA, B. A.; LAZZARI, F. A. **Monitoramento de fungos no milho em grão, grãos e farinha de milho**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18: n.4, p.363-367, 1998.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. *Effect of water activity and temperature on growth and fumonisins B1 and B2 production by Fusarium proliferatum and F. moniliforme on maize grain*. Letters in Applied Microbiology, 21: p.298-301, 1995.

MARIN, S.; MAGAN, N.; BELLÍ, N.; RAMOS, A.J.; CANELA, R.; SANCHIS, V. *Two-dimensional profiles of fumonisins B1 production by Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain*. International Journal of Food Microbiology, 51: p.159-167, 1999a.

MARIN, S.; HOMEDES, V.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; MAGAN, N. *Impact of Fusarium moniliforme and F. Proliferatum colonization of maize on calorific losses and fumonisins production under different environmental conditions*. Journal of Stored Products Research, 35: p.15-26, 1999b.

MAZIERO, M. T., BERSOT, L. S. **As micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil**. Jornal de produtos agro-industrial, Campina Grande, 12: n.1, p.89-99, 2010.

MILLER, J.D. ***Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research***. J. Stored Prod. Res., 31: n. 1, p. 1-16, 1995.

MILLS, J. T. ***Ecology of mycotoxigenic Fusarium species on cereal seeds***. J Food Prot, 52: 737-42, 1989.

NELSON, P.E.; TOUSSOUM, T.A.; MARASSAS, W.F.O. ***Fusarium species: an illustrated manual for identification***. University Park (PA): Pennsylvania State University Press, 193 p., 1983.

PEZZINI, Vanessa; VALDUGA, Eunice; CANSIANI, Rogerio L. ***Incidence of fungi and mycotoxins in stored maize under different conditions***. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.) 64 n.1 São Paulo, SP, 2005.

PHOKU, J. Z.; BARNARD, T. G.; POTGIETER, N.; DUTTON, M. F. ***Fungal dissemination by housefly (Musca domestica L.) and contamination of food commodities in rural areas of South Africa***. International Journal of Food Microbiology, 18 January. 217: p.177-181, 2016.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. ***Fungi and Food Spoilage***. 3rd. ed. 519p. Dordrecht Springer, 2009.

REIS, G. M. **Distribuição de fungos, fumonisinas e expressão de genes diversão em transgênica grão de milho da semeadura até a colheita**. Tese de doutorado em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP, São Paulo. 117 p., 2014.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética de estirpes de Fusarium verticillioides e Aspergillus flavus isolado**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 174p, 2010.

RODRIGUEZ, J.C .; MALINARICH, H.D .; EXILAR J.P .; Nolasco, M .; ESCANDE A. **Fúngica crescimento e produção de micotoxinas em milho armazenado em sacos plásticos inoculados com esporos de Aspergillus spp.** São Paulo - SP., 2004. Disponível em: <[http://www.ipesadobrasilcom.br/novo/_img/upload/micotoxinas%20e%20fun gos.pdf](http://www.ipesadobrasilcom.br/novo/_img/upload/micotoxinas%20e%20fun%20gos.pdf)> Acesso em: 2015/08/25.

RUBERT, Josep; SORIANO, José M.; MAÑES, Jordi; SOLER, Carla. ***Occurrence of fumonisins in organic and conventional cereal-based products commercialized in France, Germany and Spain.*** Food and Chemical Toxicology 56, p. 387–391, 2013.

SANTOS, J. P. **Métodos preventivos para controlar pragas de produtos armazenados.** In: LORINI, I .; Miike, L. H .; Scussel, V. M. Grãos Armazenados. Campinas: IBG, p. 399-441, 2002.

SAVI, Geovana D.; VITORINO, Vinícius; BORTOLUZZI, Adailton J. and SCUSSEL, Vildes M., 2013. Effect of zinc compounds on *Fusarium verticillioides* growth, hyphae alterations, conidia, and fumonisin production. *J Sci Food Agric*; 93: 3395–3402.

SAVI, Geovana D.; PIACENTINI, Karim C.; KREIBICH, Heloisa H.; STEIN, Stephanie M.; SANTOS, Karolina; MARTINS, Camila; PEREIRA, Maria E. V.; SCUSSEL, Vildes M. ***Contamination by mycotoxins in grains Rice (Oryza sativa L.) and its products - flour, meal and grits.*** Anais da Conferência Brasileira de pós-colheita, 411-419p, 2014.

SCAFF, Rejane. M. C. **FBs em derivados de milho negociados em Santa Catarina e sua relação com a saúde humana e alterações histopatológicas no fígado tratada catfish "in vivo" com fumonisinas B1.** Tese de doutorado. Florianópolis: UFSC, p. 117, 2003.

SCAFF, Rejane M. C .; Scussel, Vildes M. **As fumonisinas B1 e B2 em produtos à base de milho comercializados no estado de Santa Catarina - Sul do Brasil.** Braz. arco. Biol. tecnol. 47, n.6 Curitiba, p. 911-919, 2004.

SCUSSEL, V.M. ***Mycotoxins in foodstuffs.*** Florianopolis: Insular, p. 19 - 22, 1998.

SCUSSEL, V.M. ***Fungi in stored grains.*** In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (ed). Grain storage. Campinas: IBG, p.675-804, 2002.

SCUSSEL, V. M.; BEBER, M.; TONON, K. M. ***Gibberella zeae disease effect as winter grain.*** In: *Gibberella zeae* in Winter Cereals, Erlei Melo Reis (Eds). pp: 131-175, 2011.

SHEPHARD, G.S., MARASAS, W.F.O., LEGGOTT, N.L.,

YASDANPANAH, H., RAHIMIAN, H. e SAFAVI, N. ***Natural occurrence of fumonisins in maize from Iran. J. Agric. Food Chem.***, 48, p. 1860-1864, 2000.

SILVA, N. da; TANIWAKI, M.H. .; JUNQUEIRA, V.C.A. .; SILVEIRA, N.F.A. .; NASCIMENTO, M. S. Faz; GOMES, R.A.R. **Métodos microbiológicos de análise em alimentos e água: Manual de laboratório**. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brasil. CRC Press / Balkema, Taylor & Francis Grupo, Londres: Reino Unido, 484p., 2013.

TANIWAKI, M.H.; DA SILVA, N. ***Fungi in foods: occurrence and detection***. Campinas: Institute of Food Technology, p. 82., 2001.

WA_SKIEWICZ, Agnieszka; BESZTERDA, Monika; GOLI_NSKI, Piotr. ***Review Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem***. Food Control, 26, 491 – 499, 2012.

WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. ***Corn: Chemistry and Technology***. American Association of Cereal Chemist, St. Paul, MN., 1987.

CAPÍTULO III – Artigo II

SEGURANÇA DE MILHO (*Zea mays* L.) E PRODUTOS DERIVADOS PROVENIENTES DE RONDÔNIA, NORTE DO BRASIL

RESUMO

Foram investigados milho de pipoca e derivados de milho (40) produzidos, processados e comercializados no estado de Rondônia, quanto à sua segurança para o consumidor (*humano* e *animal*) no que se refere à fungos e fumonisinas (FBs: FB₁ e FB₂). Dentre os gêneros identificados o *Fusarium*, seguido por *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* sp. foram isolados com maior predominância. Os produtos para consumo *humano* apresentaram carga fúngica inferior ao limite máximo tolerável brasileiro ($<1 \times 10^3$ UFC/g) variando entre $1,0 \times 10$ UFC/g e $8,1 \times 10^2$ UFC/g. Já o produto com maior contaminação (carga fúngica) foi a quirela destinada ao consumo *animal* com contagem fúngica entre $9,1 \times 10^2$ UFC/g e $1,6 \times 10^3$ UFC/g. Com relação à contaminação por FBs, 40% das amostras (16) apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação para FB₁ e FB₂ (12,5 e 31,3 µg/kg, respectivamente). O milho de pipoca foi o produto que apresentou menor índice de FB_{total} detectável por cromatografia líquida de alta eficiência (FB₁ 12,72 µg/kg). Todos os produtos apresentaram contaminação por FBs menor que os relatados por outros autores, com valores muito inferiores ao permitido pela legislação brasileira, estando seguros para o consumo. Apesar da região Norte apresentar condições favoráveis (clima) para o desenvolvimento fúngico, foi observado que o controle de teor de umidade e atividade de água foram respeitados durante a armazenagem (12,42% e 0,63, respectivamente), reduzindo assim a possibilidade de proliferação fúngica a teores prejudiciais à saúde humana e animal.

PALAVRAS-CHAVE: *Fusarium*, FBs, segurança, quirela / quirera, derivados de milho (*Zea mays* L.).

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se mantém como o terceiro maior produtor mundial de milho, segundo o 9º levantamento da *United States Department of Agriculture* em 2016 (USDA, 2016). A produtividade de milho/área está mais eficiente, a safra de 2014/2015 excedeu o consumo interno (estimado em 55 milhões) em 30 milhões de toneladas, ficando disponíveis para exportação (BRASIL, 2016).

A qualidade física e o valor comercial dos grãos de milho estão diretamente relacionadas à integridade do grão em relação à presença de defeitos (trincas, fissuras, grãos quebrados e impurezas), geralmente produzidas por dano mecânico (durante a colheita e a movimentação do grão), ou por dano térmico (altas temperaturas) no processo de secagem (ASCHERI e GERMANI, 2004; BENTO, 2011). Os grãos quebrados, trincados, porém de qualidade nutricional satisfatória, são processados e beneficiados, para obtenção de alimentos derivados de milho, ou ainda, destinados à ração animal.

A transformação do milho em diversos derivados possibilita o uso desse cereal como excelente fonte de matéria-prima para a indústria de alimentos. Do milho, obtêm-se em torno de noventa derivados diferentes; entre esses, os principais são *grits*, fubá, canjica, óleo, amido, amilose, amilopectina, zeína e fibras (GONÇALVES *et al*, 2003).

O processo de moagem via seca, não exige investimentos tecnológicos tão grandes e pode ser realizado por pequenas e médias empresas. A partir da matéria prima, o grão de milho passa por etapa de retirada do germe do milho, onde são atritados até que o pericarpo seja separado do grão e o gérmen solto (PINAZZA, 2007; GERMANI, 2015). Neste processo o grão já limpo e seco é degerminado e separado em endosperma e germe. O germe passa por processo de extração, para obtenção do óleo de milho e farelo. Já o endosperma é moído e selecionado para obtenção de produtos finais como farinhas, fubás e cremes. Desse processo de degerminação, é obtido a canjica (PINAZZA, 2007). A canjica (3,5 a 6 *mesh*) é em alguns casos previamente tratada com vapor (pré-cozimento) e posteriormente passa por uma prensagem (em forno rotativo, à temperatura aproximada de 300°C), para obtenção dos flocos de milho (GERMANI, 2015) ou ainda da canjica, são obtidos a quirela grossa/canjiquinha (10 a 20 *mesh*), quirela média (15 a 30 *mesh*) e fina (30 a 40 *mesh*). O diferencial é o tamanho das partículas e sua granulometria (PENTEADO, 1983). A farinha de milho (60 *mesh*) é obtida pela torra do grão de milho

degerminado ou não, previamente macerado, socado e peneirado (CARDOSO *et al*, 2011).

O desenvolvimento fúngico ainda no campo é responsável pela deterioração de grãos (pericarpo e gérmen) ou planta, o que pode ocorrer também durante o armazenamento, se houverem as condições necessárias, como umidade, temperatura e nutrientes (LAZARI, 1997; SCUSSEL, 1998; BENTO *et al*, 2012). Os gêneros que se destacam são *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., e *Penicillium* spp. Esses fungos, além de causarem severos danos aos grãos, são conhecidos também pelo seu elevado potencial em produzir micotoxinas (SWEENWY e DOBSON, 1998; LINO, 2004).

O milho e produtos derivados são alimentos com alto potencial de contaminação por micotoxinas (IAMANAKA *et al*, 2010). A identificação de espécies fúngica contaminantes é um importante sinalizador da presença de micotoxinas nos substratos e indica o caminho para prevenir sua produção (Pozzi *et al*, 1995), assim como para evitar riscos alimentares (BENTO *et al*, 2012).

Pesquisadores buscam avaliar a qualidade dos derivados do milho, no Brasil e no mundo, devido a importância do milho na alimentação humana e animal a encontraram os principais gêneros toxigênicos, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Outros gêneros foram isolados em menor número. Dentre as micotoxinas, foram pesquisadas principalmente fumonisinas (FBs) e aflatoxinas (MILLER, 1995; MACHINSKI e SOARES, 2000; VAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2006; KAWASHIMA e SOARES, 2006; CRUZ, 2010; FERREIRA *et al*, 2014; GENEROTTI *et al.*, 2015; BRYLA *et al*, 2016).

Por sua vez, o grande volume de chuvas no ano de 2014 que atingiu Rondônia, Acre e Amazonas, no Norte do país, ocasionou a cheia histórica do rio Madeira. As proporções dos agravos gerados pela cheia não só afetaram o modo de vida das populações ribeirinhas (MERCADO, *et al*, 2015; FONTENELE *et al*, 2014), como também podem ter afetado a qualidade dos alimentos cultivados no estado.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a incidência e sua caracterização dos fungos, bem como a ocorrência de FBs em derivados de milho (produzidos, armazenados, processados) comercializados em diferentes municípios, localizados no estado de Rondônia (RO).

2. MATERIAL

2.1 Amostras

Foram adquiridas em embalagens fechadas de (0,5 - 1,0kg) e a granel em feira pública, acondicionados em sacos de polietileno estéreis, sendo milho de pipoca (5) e derivados de milho, dentre os quais, *canjica branca* (7), *canjica amarela* (6), *canjiquinha* (6), *farinha de milho* flocada (4), *quirela* também conhecida como quirera (2) para consumo humano e *quirela* (10) para consumo animal, totalizando 40 amostras (Figura 1). Todas as amostras foram cultivadas, processadas e comercializadas no estado de Rondônia, Norte do Brasil (Figura 2).

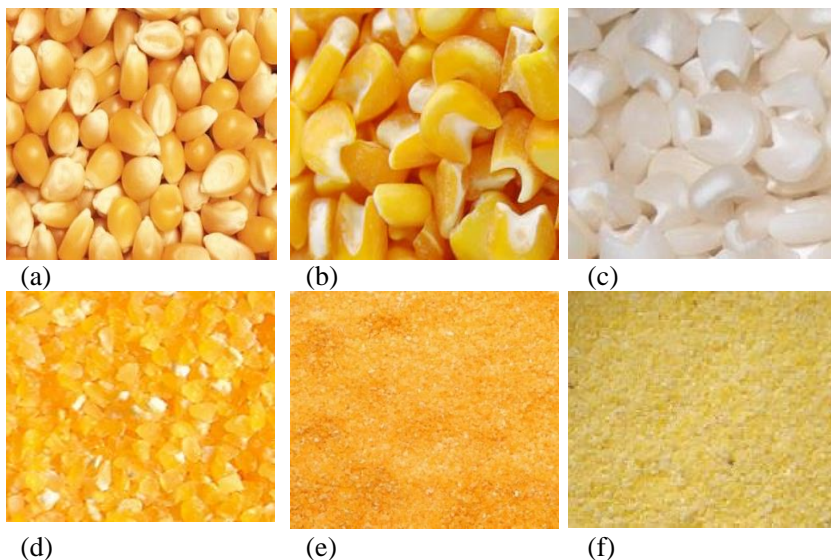
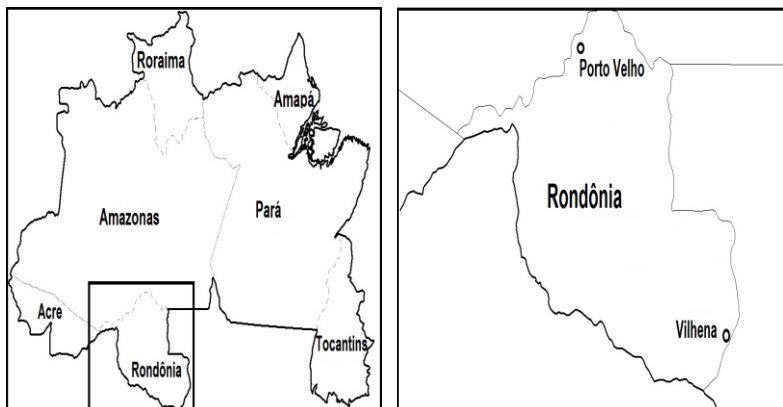


Figura 1. Milho e derivados – (a) milho para pipoca, (b) Canjica amarela, (c) canjica branca, (d) canjiquinha, (e) quirela e (f) farinha de milho.



(a)

(b)

Figura 2. Região Norte, com ênfase do estado de Rondônia (a). Estado de Rondônia (b), com ênfase nas áreas de coleta das amostras, Porto Velho e Vilhena (Adaptado IBGE, 2016).

2.2 Reagentes, solventes, padrões e meios de cultura

2.2.1 reagentes - ácido acético e metanol, Labsynt (Diadema, SP, Brasil), ortho-ftaldeído (OPA), Merck (Jacarepagua, RJ, Brasil), **álcool etílico**, todos grau analítico; **2.2.2 Solventes** - Água destilada; Água MilliQ, da Millipore, (St. Louis, MO, EUA); **2.2.3 Padrões** - FBs (FB₁ e FB₂) da Sigma Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, EUA); **2.2.4 Meios de cultura**: PDA (do inglês, Potato Dextrose Ágar - PDA - Acumedia /Neogen de Michigan, USA), MEA (extrato de malte agar) e peptona bacteriológica, Himedia, (Mumbai, Índia); G25N (Czapek-Dox, 25% de nitrato de glicerol) e CYA (extrato de levedura Czapek), todos Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); **2.2.5 outros** - sacarose, glicerina líquida, cloranfenicol, todos da Kyma (Americana, SP, Brasil), hidróxido de sódio e potássio, fosfato, cloreto férrico, carbonato de cobre e sulfato de sódio da Merck (Jacarepaguá, RJ, Brasil).

2.3 Equipamentos

Autoclave vertical, Phoenix (Araraquara, SP / Brasil); câmara de fluxo laminar, Veco (Campinas, SP / Brasil); cabine bacteriológica, Fanem (São Paulo, SP / Brasil); estufa Quimis (Diadema, SP / Brasil); sistema de cromatografia de alta eficiência (CLAE), com bomba

isocrática, injetor de amostras automático SIL-20A, com detector fluorescência (FLN) modelo RF-10A XL, todos da Shimadzu (Kyoto/Japão); coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ (com 250 mm / 4,6 mm / 5 µm para comprimento / diâmetro interno / tamanho de partícula, respectivamente) Phenomenex (Torrance / USA); moinho de laboratório Romer (Miami, USA); balança analítica (faixa 0.01-210 g), Ohaus, (Parsippany, USA); bomba vácuo Millipore (São Paulo, Brasil); extrator à vácuo, Phenomenex (Torrance / USA); Bloco de aquecimento Tecnal (Piracicaba, SP / Brasil); medidor de a_w Aqualab, Decagon (Pullman, Washington / USA); destilador Marconi (São Paulo, Brasil); filtro de água mili-Q Millipore (St. Louis, MO, USA) e microscópio óptico Olympus (CX22, Tokyo, Japão).

2.4 Outros materiais

Microseringa (50 µL), Hamilton (Reno, Nevada, EUA); micro pipetas (100 µL e 100-1000 µL), Kasvi (Xangai, China); dessecadores de borossilicato (200 mm de diâmetro), os cadinhos de porcelana (Ø 5 cm), placas de petri (vidro e descartáveis), Praxair (Danbury, CT / EUA); gás nitrogênio, White Martins (Florianópolis, SC); filtro de papel (#4), Whatman (Maidstone / Inglaterra); sacos de polietileno estéreis (15 x 20 cm), Seward (Davie, FL / EUA) e colunas de extração em fase sólida (SPE), SAX (6 cm³, 500 mg¹), Phenomenex (Torrance / EUA).

3. MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Milho e derivados foram adquiridos (embalagens fechadas de 0,5 - 1,0 kg) nos meses de novembro e dezembro de 2014, em supermercados, feiras públicas e agropecuárias (quiereira/quirera) em dois pontos do estado de RO, Porto Velho (PVH - capital, extremo norte do estado, atingida pela enchente – região A) e Vilhena (VLH - extremos sul do estado - região B). As amostras provenientes de outros municípios do estado foram agrupadas de acordo com a proximidade das regiões e encaminhadas para as análises no laboratório de Micotoxologia e Contaminantes Alimentares (LABMICO).

3.2 Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas assepticamente, e divididas em diferentes porções para análises de teor de umidade, atividade de água (a_w) e FBs (2, 2 e 50 g, respectivamente) e testes micológicos (25 g, contagem total /identificação de gêneros e espécies). As amostras com maior granulometria foram moídas no moinho Romer com quartejamento e separadas assepticamente para as análises.

3.3 Testes micológicos

Foram realizadas *contagem total de fungos (CTF)* isolamento de colônias e identificação de espécies de fungos foram realizadas como descrito por Nelson *et al*, 1983, Pitt e Hocking, 2009, Silva e colaboradores, 2013. Resumidamente, *3.4.1 CTF* - amostra moída (25 g) foi assepticamente transferida para um saco de polietileno com adição de água peptonada (225 ml - 10^{-1}), homogeneizados (2 min) e uma alíquota (1 ml) foi transferida para um tubo de ensaio (10^{-2}), contendo 9 ml de água de peptona, deste tubo de ensaio, foi retirado 1ml para diluição 10^{-3} . Uma alíquota de 0,1 ml das diluições 10^{-2} e 10^{-3} foram inoculados em meio PDA (pH 5,6) contendo cloranfenicol, utilizando a técnica de semeadura em superfície e foram incubadas a 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) em duplicata, durante 7 dias; *3.4.2 fungos colônias de isolamento* - Para inoculação, um fragmento de colônia crescida em PDA foi introduzida no centro da placa nos meios MEA, CYA e G25N. As placas foram incubadas a 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 7 dias. Logo após foi realizada a análise macroscópica. *3.4.3 identificação da espécie* - fragmentos de colônias crescidas em MEA, CYA e G25N foram então aplicadas sobre o meio Czapek-dox, com sobreposição de uma lamínula, com a técnica de microcultivo, incubadas durante 3 a 7 dias numa estufa a 25°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). A lamínula, com parte do crescimento da colôniarepicada, foi transferida para uma lâmina contendo corante azul de algodão lactofenol. As estruturas fúngicas coradas foram visualizadas sob um microscópio óptico com lentes de aumento de 100 e 400x.

3.4 Análise de fumonisinas

A determinação de FBs (FB₁ e FB₂) em amostras de milho e derivados foi realizada através do método oficial internacional n. 995.15 (AOAC, 2005b), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),

com detector fluorescência (FLN). O comprimento de onda foi fixado em 218 nm e a fase móvel (Metanol com tampão fosfato) em fluxo constante de 1,0 ml / min com uma temperatura de coluna de 28°C. Foram transferidas assepticamente para um liquidificador industrial anti-exploração a porção previamente preparada, sendo realizada a extração por solvente (metanol: água - 80:20 por 2 minutos). O cartucho de coluna SAX foi condicionado com metanol PA e metanol:água (80:20). Foram filtrados 10mL. Após a limpeza do cartucho (metanol:ácido acético - 99:1) houve a extração das FBs, e o eluato foi seco em corrente suave de gás nitrogênio e aquecimento 40°C. Foi então redissolvido com metanol grau CLAE. Antes de aplicar no aparelho CLAE, a alíquota foi derivatizada, adicionando o OPA. A aplicação em CLAE foi realizada dentro do período de 2 minutos após a derivatização. Após a detecção, os dados foram obtidos para tratamento com posterior análise dos resultados.

3.5 Umidade

Foram realizadas as análises de umidade e atividade de água. (3.3.1) *Determinação do conteúdo de umidade* - foi realizada conforme método AOAC (2005a), em duplicata, a qual consiste em secagem da amostra em estufa ($110^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), baseado na remoção da água por aquecimento. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio, com massas previamente determinadas, permanecendo na estufa até peso constante. Após secagem na estufa até peso constante, os cadinhos contendo as amostras foram, então, resfriados à temperatura ambiente com auxílio de dessecador, tendo sua massa determinada. Foi calculada, então, a porcentagem de umidade nas amostras e o desvio padrão considerando as análises em duplicata. (3.3.2) *Determinação da atividade de água* - foi obtida através da medição de uma porção de 2 g de cada amostra em aparelho Aqualab 4 TE Series com temperatura de 25° C (DECAGON, 2001).

3.6 Estatística

Para o teste de Tukey, foi utilizado o programa Statix 8.0. Os resultados serão apresentados como média \pm desvio padrão e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de derivados de milho (cultivados e processados em RO) avaliadas, a presença de fungos foi detectada, embora em alguns produtos com o mínimo de crescimento. Quanto à contaminação por FBs, essa variou entre os produtos, sendo a canjiquinha e o milho de pipoca os que apresentaram os menores teores de contaminação. Detalhes da contaminação fúngica e FBs estão descritos nas Tabelas 1 a 3.

4.1 Fungos e fumonisinas

Com relação a contaminação das amostras, as que apresentaram os maiores índices de contaminação variaram entre os Tipos de produtos e a região (**A** ou **B**) de RO de coleta. A região **A** foi afetada diretamente pelo período de chuvas excessivas, resultando em maior contaminação por *Fusarium*, sendo o principal gênero responsável pela produção de FBs, ainda no campo. Todas as amostras destinadas ao consumo humano estavam em condições próprias para consumo.

4.1.1 Fungos

a) Carga fúngica - dentre os grãos de milho para pipoca e derivados de milho cultivados / produzidos em RO, houveram cinco amostras (canjiquinha, canjica amarela e farinha de milho), em que mesmo na menor diluição investigada, fungos não foram detectados, representando 12,5% do total de 40 amostras. Durante o processamento industrial dos derivados do milho, pode haver a inativação / destruição dos esporos e/ou a retirada física dos fungos (sem gérmen e/ou pericarpo) dos produtos manufaturados, mas isto não significa que estejam livres da presença das toxinas produzidas pelos fungos que as contaminaram previamente, devido ao fato de serem mais difíceis de degradar e ainda podem estar viáveis (BERTOLIN *et al.*, 2003, COSTA e ZANELLA, 2012). Quinze amostras apresentaram baixa contagem de fungos, conforme Tabela 1, principalmente a canjica branca da qual é extraído tanto o gérmen, quanto o pericarpo. Dos produtos analisados para consumo humano, as duas amostras de quirela foram as que apresentaram maior contagem de colônias ($7,9 \times 10^2$ e $8,1 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente), ambas foram coletadas em feiras públicas, ficando expostas à umidade e temperatura ambiente, uma vez que são comercializadas à granel. Todas as amostras para consumo humano apresentaram contagem total de fungos inferiores ao permitido pela legislação que é de 1×10^3 UFC/g (BRASIL, 2001).

Tabela 1. Contagem total de fungos por tipo de produto de milho, provenientes do estado de Rondônia (safra 2014/1 e 2014/2), região Norte do Brasil

	PRODUTO	CTF ^a (UFC/g)	Mín ^b	Máx ^c
Canjiquinha	01	1,5x10 ²	<10	1,5x10 ²
	02	<10		
	03	1,0x10		
	04	<10		
	05	1,0x10		
	06	2,0x10		
Canjica amarela	07	8,0x10	<10	8,0x10
	08	<10		
	09	1,0x10		
	10	2,0x10		
	11	1,0x10		
	12	<10		
Canjica branca	13	2,0x10	1,0x10	2,2x10 ²
	14	2,2x10 ²		
	15	1,0x10		
	16	1,0x10		
	17	1,0x10		
	18	1,0x10		
	19	1,0x10		
Milho pipoca	20	8,0x10	8,0x10	3,8 x10 ²
	21	8,0x10		
	22	3,8 x10 ²		
	23	1,0x10		
	24	2,0x10		
Quirela - humano^d	25	7,9x10 ²	7,9x10 ²	8,1 x10 ²
	26	8,1 x10 ²		
Quirela - animal^e	27 - 36	Até 1,6x10 ³	9,1x10 ²	1,6x10 ³
Farinha de milho^f	37	<10	<10	1,1x10 ²
	38	<10		
	39	4,0x10		
	40	1,1x10 ²		

^aCTF =Contagem total de fungos; ^bMín = número mínimo encontrado; ^cMáx = número máximo encontrado; ^dQuirela para consumo humano; ^eQuirela para consumo animal; ^fFarinha de milho flocada.

O produto com maior contagem fúngica, em número total de colônias (mín. 9,1x10²e máx. 1,6x10³UFC/g) foi a quirela destinada ao consumo *animal*. Resultados semelhantes foram observados por Generotti e colaboradores (2015). Sabe-se que o milho destinado à ração animal é de baixa qualidade, por conseguinte, maior contaminação foi

confirmada. Dentre os demais produtos, a contaminação pode ter ocorrido devido às condições favoráveis de crescimento de fungos, ácaros e insetos, ainda no campo, ou durante a armazenagem dos grãos/produtos já processados, se houve o descontrole do teor de umidade e monitoramento de temperatura (SCUSSEL, 2002; COSTA e ZANELLA, 2012).

b) Gêneros e espécies isolados e identificados - a predominância do gênero *Fusarium* entre as amostras foi de 50%, seguidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e outros (*Trichoderma*). Houve co-ocorrência entre os principais gêneros na maioria das amostras. Costa e Zanella (2012) isolaram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* nas amostras de produtos de milho provenientes do estado do Mato Grosso. Os mesmos gêneros também foram detectados em estudos no país (nos estados do Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo) com inclusão de outros gêneros, de acordo com a região (ONO *et al*, 2006; BENTO *et al*, 2012; CATÃO *et al*, 2013; FERREIRA *et al*, 2014). A contaminação por *Fusarium* ocorre ainda no campo, o que significa, que com as condições proporcionadas *in vitro*, os esporos desse fungo puderam se desenvolver. Durante a estocagem, o teor de umidade e a_w dos produtos foram reduzidos, mantendo-os inativos, uma vez que necessitam de elevada umidade relativa do ar (90%) e elevados teores de água nos grãos (20 a 21%) para desenvolver-se (LAZZARI, 1997; PINTO, 2007; BENTO, 2011). Conforme os resultados obtidos descritos na Tabela 2, foram isolados 5 gêneros e 19 espécies de fungos nas amostras analisadas.

4.1.2 *Fumonisin*as

a) Validação do método - de acordo com a validação do método analítico, as curvas de calibração foram lineares nas concentrações de 0,0002-0,05 µg/ml, com coeficientes de correlação R^2 de 0,994 e 0,996 para FB_1 e FB_2 , respectivamente. Os limites de detecção foram de 2,5 e 6 µg/kg e os limites de quantificação foram de 12,5 e 31,3 µg/kg, ambos para FB_1 e FB_2 , respectivamente. As recuperações médias nas amostras de milho foram de 70, 85 e 90% para as concentrações de 50, 250 e 500 µg/kg.

Tabela 2. Identificação de fungos em derivados do milho do Estado de Rondônia, safras 2014/1 e 2014/2

Gênero	Espécie	Amostras positivas
<i>Fusarium</i>	<i>verticillioides</i>	20
	<i>ploriferatum</i>	10
	<i>poae</i>	04
	<i>culmorum</i>	04
	<i>solani</i>	02
	<i>langsethiae</i>	02
	<i>semitectum</i>	01
	<i>acuminatum</i>	01
	não identificado	02
<i>Aspergillus</i>	<i>ninger</i>	08
	<i>novofumigates</i>	05
	<i>nivea</i>	04
	<i>tereus</i>	03
	<i>flavus</i>	03
	<i>flavipes</i>	02
	<i>ibericus</i>	01
	não identificado	01
<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	07
	<i>nordicum</i>	03
	não identificado	04
<i>Trichoderma</i>	<i>sp.</i>	04

*Total de amostras = 40. Não foram detectados fungos em 06 amostras.

b) Teores de FBs detectados nos produtos de RO - dos produtos analisados, 60% das amostras (24) apresentaram contaminação por FBs e 40% das amostras (16) teores abaixo do LOQ para FB₁ e FB₂, sendo 10 amostras da região **A** (Porto Velho) e 6 da região **B** (Vilhena), conforme Tabela 3. O milho de pipoca foi o produto que apresentou o menor índice de FBs detectável, sendo que das 5 amostras analisadas, apenas uma estava contaminada (FB₁ 12,72 µg/kg), proveniente da região **A**. A canjiquinha foi o segundo produto com menor contaminação, de seis marcas analisadas, apenas uma estava contaminada (FB₁ 19,19 µg/kg – na região **A**), valor inferior ao encontrado por Ferreira e colaboradores (2014) que também avaliaram canjiquinha reportando 60,0 µg/kg para FB_{total}. Das 06 amostras de canjica amarela, 3 apresentaram baixa contaminação (mín. para FB₁: 28,82 e máx. para FB_{total}: 79,01 µg/kg), sendo as duas com maiores teores de contaminação, provenientes da safra 2014/1 (pós período excessivo de chuva), provenientes da região A e B. Dentre as 7 amostras analisadas de canjica branca, 5 estavam contaminadas (mín. FB₁ 18,6 e

máx. FB_{total} 64,52 $\mu\text{g/kg}$), sendo constatado que 2 amostras com maior teor de contaminação, também eram provenientes da safra 2014/1.

Neste estudo, das 4 amostras de farinha de milho flocada analisadas, apenas uma apresentou contaminação, com teor para FB_{total} de 189,41 $\mu\text{g/kg}$ (região A - safra 2014/2), sendo o segundo produto com maior incidência de FBs. Scaff e Scussel (2004) analisaram a incidência de FBs (FB_1 e FB_2) em milho de pipoca, canjica e farinha de milho comercializados em Santa Catarina, e verificaram que 92,68% das amostras encontravam-se com teores detectáveis de FBs, sendo que a farinha de milho foi o produto que obteve o maior índice de contaminação. Ferreira *et alli*, (2013) no estado de Minas Gerais, encontraram contaminação em 50% das amostras de derivados do milho para FBs, no entanto, apesar de contaminadas se encontravam com níveis abaixo dos limites máximos tolerados (LMT - FBs totais: 2000 a 2500 $\mu\text{g/kg}$) no Brasil (BRASIL, 2011).

Foram analisadas 2 amostras de quirela para consumo humano, ambas estavam contaminadas com teores de 139,64 $\mu\text{g/kg}$ (região A) e 206,57 $\mu\text{g/kg}$ (região B), provenientes da safra 2014/2. Dentre as 10 amostras analisadas de quirela para consumo animal, todas apresentaram contaminação. Os níveis variaram entre 186,97 a 1.553,1 $\mu\text{g/kg}$, provenientes da região B, safra 2014/2, conforme demonstra a Figura 3.

De acordo com o teste de Tukey, aplicado entre as regiões A e B, o valor encontrado foi de $p < 0,05$, indicando que há diferença significativa entre elas. Uma justificativa para tal resultado é que, não houve distribuição equilibrada na aquisição de amostras para consumo animal, sendo coletadas na região B, com maiores índices de contaminação por FBs.

Segundo a legislação brasileira os LMT de FBs para farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha para consumo humano estão estabelecidas com o máximo de 2500 $\mu\text{g/kg}$, e no ano de 2016 esse valor foi reduzido para 1500 $\mu\text{g/kg}$ (BRASIL 2011; 2013). Os dados descritos demonstram a boa qualidade dos produtos para consumo humano, quanto à contaminação por FBs, sendo que seus valores estão muito abaixo dos limites máximos toleráveis pela legislação brasileira, inclusive para aplicação posterior.

Tabela 3. Teores de fumonisinas em produtos de milho provenientes de duas regiões do estado de Rondônia, Norte do Brasil, safra 2014/1 e 2014/2

REGIÃO A (PVH)					REGIÃO B (VLH)					
Produto	Nº	FB ₁	FB ₂	FB _{TOTAL}	Produto	Nº	FB ₁	FB ₂	FB _{TOTAL}	
Canjiquinha	1	19,19	>LOQ	19,19	Canjiquinha	2	ND	ND	ND	
	3	ND	ND	ND		4	>LOQ	ND	>LOQ	
	Canjica Amarela	5	ND	ND	ND	Canjica Amarela	7	ND	>LOQ	>LOQ
6		ND	ND	ND	12		>LOQ	55,35	55,35	
Canjica Branca		8	>LOQ	ND	ND	Canjica Branca	13	>LOQ	35,14	35,14
		9	20,67	58,34	79,01		18	18,6	>LOQ	18,60
	Canjica Branca	10	28,82	>LOQ	28,82	Milho pipoca	20	>LOQ	>LOQ	>LOQ
11		ND	>LOQ	ND	22		>LOQ	>LOQ	>LOQ	
Canjica Branca		14	>LOQ	>LOQ	ND	Quirela - humano	26	42,01	97,63	139,64
		15	64,52	>LOQ	64,52		27	205,08	126,43	331,51
	Milho pipoca	16	ND	ND	ND	Quirela - animal	28	105,92	79,42	185,34
17		61,52	>LOQ	61,52	29		111,07	75,90	186,97	
Milho pipoca		19	53,06	>LOQ	53,06	30	845,89	441,64	1287,53	
		21	ND	ND	ND	31	972,61	162,71	1135,32	
	23	12,76	>LOQ	12,76	32	989,30	563,80	1553,10		
Quirela - humano	24	ND	>LOQ	ND	Quirela - humano	33	816,36	448,41	1264,77	
	25	92,09	114,48	206,57		34	395,45	233,69	629,14	
	Farinha milho ¹	38	ND	ND	ND	Farinha milho ¹	35	585,79	350,15	935,94
		39	>LOQ	>LOQ	ND		36	221,17	71,42	292,59
40		126,44	62,97	189,41	Farinha milho ¹	37	ND	ND	ND	
Média		23,95	11,79	36,68	Média	266,00	137,67	403,67		
DP		36,67	30,52	60,89	DP	363,30	175,57	526,20		
DPR%		6,06	5,52	7,80	DPR%	19,06	13,25	22,94		

¹Farinha de milho floccada; total de amostras = 40; ND = não detectado; LOQ = limite de quantificação para FB₁ e FB₂ (12,5 e 31,3 µg/kg, respectivamente). DP: desvio padrão RDP: desvio padrão relat

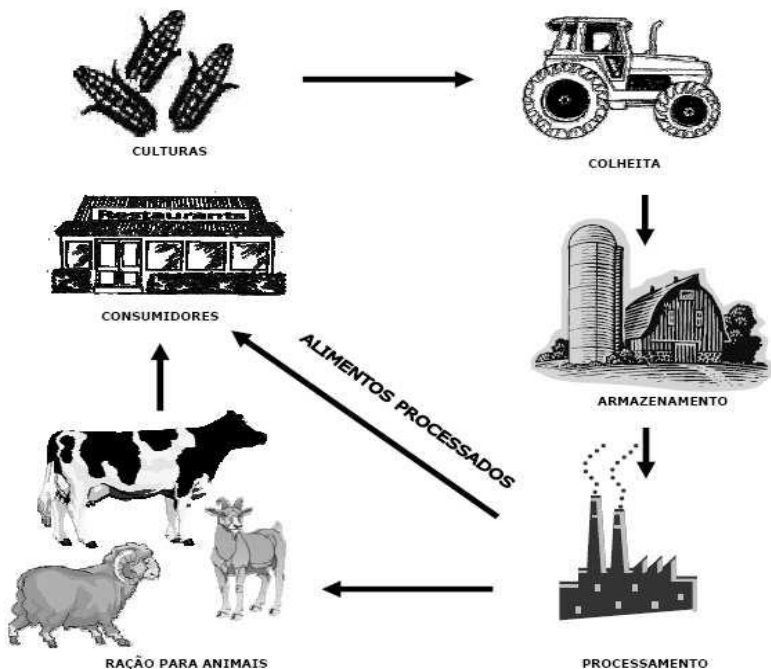


Figura 3. Teores de FBs encontrados em quirela para consumo humano (n.25 e 26) e consumo animal (n.27-36) provenientes do estado de Rondônia, safra 2014/2.

4.2 Contaminação versus Características das amostras

4.2.1 Milho pipoca e derivados

No que se refere à segurança do milho (fungos / FBs) e características dos produtos avaliados, as amostras apresentaram baixa contaminação, variando com os diferentes processamentos a que foram submetidos e alterações na morfologia original dos grãos. Também, o destino a que os produtos foram processados (para consumo *humano* ou *animal*). Os grãos, por possuírem estrutura mais rígida, o pericarpo constitui barreira física contra a entrada de fungos no endosperma dos grãos e sua retirada, pode ser responsável pela redução dos teores de micotoxinas nos produtos processados em relação aos grãos inteiros. Assim, os baixos teores de micotoxinas detectados nos produtos analisados (principalmente canjicas) no presente trabalho e em outros

(MARQUES, 2007; CRUZ, 2010; FERREIRA *et al*, 2014) podem ser justificados por este fato.

Dos produtos analisados, foi observado que as *canjicas* (branca e amarela), por suas características de processamento, apresentaram baixa contagem de fungos (<10 a $2,2 \times 10^2$ UFC/g). Apenas duas amostras da região A e uma da região B, apresentaram contaminação por FBs, sendo que a maior contaminação das duas regiões, eram provenientes da safra 2014/1, época que RO foi atingida por precipitações atípicas.

Das seis amostras de *canjiquinha* analisadas, que provêm da canjica (degerminada), apresentaram menor crescimento de fungos (<10 a $1,5 \times 10^2$ UFC/g). Apenas uma amostra apresentou contaminação por FB₁ (19,19 µg/kg), safra 2014/1.

A respeito da *farinha de milho* flocada, além do processo de degerminação do milho com obtenção da canjica, esta é triturada, umidificada e passa por processamento térmico à 300° C, logo apenas uma amostra apresentou crescimento fúngico um pouco elevado ($1,1 \times 10^2$ UFC/g) em relação as demais. Esta amostra apresentou ainda, contaminação por FBs (189,41 µg/kg), proveniente da Região A, safra 2014/2. Estes dados confirmam que as micotoxinas são termo resistentes quando presentes no alimento.

A *quirela* (30 a 40 Mesh), com menor granulometria que a canjiquinha (10 a 20 Mesh), com finalidade da alimentação humana, foi adquirida em feiras-públicas, acondicionadas em sacas de 50 kg, em temperatura ambiente e abertas (contato com umidade e contaminantes do meio ambiente). Ambas as amostras, da região A e B apresentaram contagem de fungos elevadas, se comparadas às amostras anteriores, entre $7,9 \times 10^2$ UFC/g e $8,1 \times 10^2$ UFC/g. A amostra da região A, apresentou maior contaminação por FBs (206,57 µg/kg) do que a proveniente da região B (139,64 µg/kg).

As amostras de *quirela* para alimentação animal apresentaram contagens de fungos com maior crescimento e variedade de gêneros e espécies devida a utilização de milho rejeitado para alimentação humana, com menor qualidade. Os valores encontrados para fumonisinas já foram discutidos no tópico a cima. A contagem total de fungos e quantidade para fumonisinas encontradas neste ingrediente da ração animal, apresentam índices aceitos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001).

O *milho de pipoca* foi o produto com menor contaminação por FBs, provavelmente devido à resistência do pericarpo, o que dificulta a entrada do fungo no interior dos grãos durante o cultivo. No entanto,

foram observados durante a contagem de colônias, que houve crescimento de fungos (1×10 e $3,8 \times 10^2$ UFC), não tendo correlação com a mínima presença de FBs.

4.2.1 UMIDADE (M_C E A_w)

Os derivados de milho apresentaram umidade entre 10,53 e 14,61%. Os com maior umidade eram tanto provenientes da safra 2014/1, quanto da 2014/2. Do total de amostras (40), somente 15% (6) apresentaram umidade elevada, entre 14,01 e 14,61%. Dentre os produtos estão a canjiquinha (3 - região A) e quirela (1 - região A; 2 - região B). Neste aspecto, a umidade encontrada favorece alguns fungos classificados como de armazenagem, pois requerem umidades mais baixas (entre 13 e 18%), sendo pouco frequentes durante o crescimento da planta no campo e nos grãos recém-colhidos. Nesse grupo, encontram-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (EMBRAPA, 2008; BENTO, 2011).

Dos produtos com maiores teores de a_w , 5 deles coincidiram com os teores mais elevados de umidade, sendo canjiquinha (3 - região A e 2 - região B), no entanto índices semelhantes foram observados nos produtos canjica amarela e branca (0,68-0,69). Os menores teores de a_w foram encontrados na farinha de milho (0,42- 0,58). A média geral de todos os produtos, referentes à a_w foi de 0,63. De acordo com Taniwaki e Silva (2001), a faixa ótima para crescimento dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* varia entre 0,75 a 0,95, portanto, as amostras estão abaixo do limite mínimo de a_w para desenvolvimento fúngico.

5. CONCLUSÃO

A presença de fungos em alimentos representa risco à saúde pública, uma vez que não são percebidos a olho nú, a não ser quando já se desenvolveram exponencialmente nos alimentos. Ainda assim, grande parte da população desconhece a natureza toxigênica de alguns gêneros e a produção de micotoxinas, altamente prejudiciais ao organismo humano e animal.

Este estudo revelou, que mesmo após um grande período chuvoso, os produtos derivados do milho cultivado, processado, armazenado e distribuído no estado de RO, estavam com níveis seguros para consumo. O processo industrial pode ter removido parte da contaminação natural do milho, além da observância das boas práticas

agrícolas, como controle de umidade e temperatura, essenciais para o desenvolvimento fúngico.

O monitoramento freqüente dos produtos alimentícios se faz necessário, para assegurar a qualidade, principalmente dos alimentos produzidos e consumidos no Brasil, uma vez que a legislação internacional é rigorosa e os alimentos de melhor qualidade são exportados.

Como um dos pioneiros estudos realizados com micotoxinas da região Norte, e o primeiro relacionado à FBs em derivados de milho desta região, é importante ressaltar a necessidade de novas pesquisas, afim de obter maior representatividade de amostras, sendo também um instrumento importante de monitoramento da qualidade dos produtos produzidos e comercializados no estado de Rondônia, região com capacidade produtora de diversos cultivares (hortifrúti, cereais e leguminosas), além da criação de animais, fonte de proteína e demais produtos de origem animal, voltados à alimentação humana.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo financiamento dos estudos durante o mestrado e aos amigos de RO, essenciais no aporte de logística e hospedagem durante a coleta das amostras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR., M. Aflatoxinas em produtos a base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. **AOAC 978.18 - Water Activity of Canned Vegetables**, 2005a. Disponível em: <<http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=18355>> Acesso em: 25/01/2016.

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC. International **Natural toxins**. 18th Edition. Gaithersburg, USA, 2005b.

ASCHERI, J.L.R.; GERMANI, R. **Protocolo de qualidade do milho**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23p., 2004.

BENTO, Larissa Fatarelli. **Qualidade física e sanitária de grãos de milho armazenados em Mato Grosso**, 2011. 71 f. Dissertação (mestrado em Agronomia tropical). Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

BENTO, L. F., CANEPPELE, M. A. B., ALBUQUERQUE, M. C. F., KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C., ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 71(1) p.44-9, 2012.

BERTOLIN, T. E.; FURLONG, E. B.; MAGAGNIN, G.; NUNES, I. L. Arroz comercializado na Região Sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciênc. Técnol. Aliment.**, 23(2): 190-194, 2003.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA C. A. F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. **Food Control**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 117-120, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada de Administração RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC No - 7 de 18 fevereiro 2011 - limites Máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial, p. 66-67, 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013. Prorrogação dos prazos LMT para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União, p. 756, 2013. Disponível em: <<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/170909/anvisa-prorroga-prazo-para-limites-maximosde-micotoxinas-em-alimentos>> Acesso em: 07/28/2014.

BRASIL - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 4 - Safra 2015/16 - Quarto levantamento**. ISSN 2318-6852, p. 1-154. Brasília, janeiro/2016.

Disponível

em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf> Acesso em: 16/01/2016.

BRYLA, Marcin B.; ROSZKO, Marek; SZYMCZYK, Krystyna; JEŁDRZEJCZAK, Renata; OBIEDZIŃSKI, Mieczysław W. *Fumonisin and their masked forms in maize products. Food Control*, (59) 619 a 627, 2016.

CARDOSO, W. S.; PINEHIRO, F. A.; MACHADO, F. P.; BORGES, J. T. F.; RIOS, S. A. **Indústria do milho**. In: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. (Ed.). Milho biofortificado. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 173-195, 2011.

CATÃO, H. C. R. M.; MAGALHÃES, H. M.; SALES, N. de L.P. ; BRANDÃO Jr., D. da S. e ROCHA, F. da S. *Incidence and viability of creole seeds of corn naturally infested with fungi in pre-and post-storage. Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.5, p.764-770, mai, 2013.

COSTA, Jose A. A.; ZANELLA Gisele N.. *Identification of filamentous fungi in derivatives maize traded in Primavera do Leste – MT. Rev. Bras. Farm.* 93 (1): 109-113, 2012. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-1-17.pdf>> Acesso em: 01/08/2014.

CRUZ, J. V. da S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**, 2010. 73 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

DECAGON Devices Inc. *Water activity meter: operator's manual*. 3. ed.:185 p., Pulman, WA: Decagon, 2001.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. GODINHO, V. P. C. **Sistema de produção para a cultura do milho em Rondônia**. 3ª Ed Porto Velho, RO: Embrapa RO, 46 p., 2008 (Sistemas de Produção / Embrapa RO, 0113-1668; 32).

FERREIRA, P.; QUEIROZ, V. A. V.; CONCEIÇÃO, R. R. P. da; MIGUEL, R. de A. **Micotoxinas em Produtos Derivados de Milho Comercializados em Minas Gerais**. Circular técnica 204, Sete Lagoas, MG, dezembro, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117125/1/circ-204.pdf>> Acesso em: 28/02/2016.

FONTENELE, S. Sampaio; ELENA, E. J. D.; LASSEN, F. de L. S.; MACIEL, F. do N.; SOUZA, E. da Silva; CAVALCANTE, M. M. de A. Cheia no Rio Madeira: diagnóstico das áreas críticas na cidade de Porto Velho - RO. **Revista Geonorte**, ed. esp. 4, v.10, n.1, p.256-261, 2014. (ISSN 2237-1419). Disponível em: <<http://periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/1690>> Acesso em: 27/02/2016.

GENEROTTI, S., CIRLINI, M., DALL'ASTA, C., SUMAN, M. *Influence of the industrial process from caryopsis to cornmeal semolina on levels of fumonisins and their masked forms*. **Food Control** 48 p.170-174, 2015.

GERMANI, Rogério. **Flocos de milho**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 02 de junho de 2015.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H.F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R.; ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. **Ciênc. Agrotec.** vol.27 n.3 Lavras May/June 2003.

IAMANAKA, Beatriz T.; OLIVEIRA, Idjane S.; TANIWAKI, Marta H. **Micotoxinas em alimentos**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.

KAWASHIMA, L. M. e SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

LAZZARI, F.A.,1997. *Moisture, fungi and mycotoxins in the quality of seeds, grain and feed*. 2nd ed. Curitiba: Ed Author, 148p.

LINO, E.; SILVA, L.J.G.; PEN, A. S. *Fumonisin: presence in foods, health implications and legislative aspects*. **Portuguese Journal of Veterinary Medicine**, RPMV99 (552) 181-192, 2004.

MACHINSKI JR., M.; SOARES, L. M. *Fumonisin B1 and B2 in Brazilian cornbased food products*. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v. 17, n. 10, p. 875- 879, 2000.

MARQUES, P. J. N. **Avaliação de aflatoxina e zearalenona em quirera (canjiquinha de milho) na região dos Campos Gerais**, 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR.

MERCADO, Damaris S.; ALMEIDA, Gabriela S.; SILVA, Yara L. S.; CORREIA, Juliana S. C. Hábitos alimentares de ribeirinhos da Amazônia e contribuições das enchentes no agravamento ao quadro de insegurança alimentar. **Saber Científico**, v. 4, n. 1, p.18 - 25, 2015.

MILLER, J.D. *Fungi and Mycotoxins in grain: implications for stored product research*. **Journal Stored Products Research**, v.31, n.1, p.1-16, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022474X9400039V>>. Acesso em: 15 ago. 2011. Doi: 10.1016/0022-474X(94)00039-V.

MORAES, V. B. **Efeito do resíduo da moagem à seco de milho, micropulverizado no metabolismo lipídico, na glicemia e na composição corporal em ratos alimentados com dieta da cafeteria**, 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

NELSON, P.E.; TOUSSOUM, T.A.; MARASSAS, W.F.O. *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. **University Park (PA): Pennsylvania State University Press**. 193p, 1983.

ONO, E. Y. S.; MENDES, A. M.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, M. A. Micotoxinas em alimentos - Progressos na imunodeteção. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 32. p. 69-80, Jan-Jun, 2004.

PENTEADO, R. **Aspectos e implicações da participação do milho na alimentação humana.** In: Cultura do milho. Brasília: EMBRATER, cap. XVII, p. 233-267, 1983.

PINAZZA, L. A. **Cadeia produtiva do Milho.** v. 1. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 108p, 2007.

PINTO, N.F.J.A.; VARGAS, E.A.; PREIS, R.A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B₁ em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.304-306, 2007.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** 3rd. ed. 519p. Dordrecht Springer, 2009.

POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O.; MEIRELLES, M.C.A. *Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence.* **Food Addit Contam**, v.12, p. 313-9. 1995.

SCAFF, Rejane M. C.; SCUSSEL, Vildes M. *Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina - Southern Brazil.* **Braz. arch. biol. technol.** 47, n.6 Curitiba, p. 911 – 919, 2004.

SCUSSEL, V.M., *Mycotoxins in foodstuffs.* Florianópolis: Insular, p. 19 - 22, 1998.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em grãos armazenados.** In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (ed). Armazenagem de grãos. Campinas: IBG, p.675-804, 2002.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W.. *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species.* **Int J. Food Microbiol.**, v. 43, p.141-58, 1998.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N.D.A. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas, **Núcleo de Microbiologia / ITAL**, 82p., 2001.

USDA, United States Department of Agriculture. **Word Agricultural Supply and Demand Estimates.** WASDE – 549, ISSN: 1554-9089,

January 12, 2016. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>> Acesso em: 18/01/2016.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. *Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por se tratarem de contaminantes em alimentos, os fungos geralmente são precipitadamente ignorados por parte da população, a qual desconhece os efeitos tóxicos para a saúde. Geralmente quando o consumidor se depara com colônias de fungos em alimentos, retiram apenas o entorno da mesma, ou desprezam uma pequena quantidade do alimento, desconhecendo o crescimento fúngico que não está visível (à olho nú), ainda menos sobre capacidade de produção de micotoxinas.

A região norte, por possuir clima favorável à vários cultivos e solo fértil, muitos cultivares são produzidos com a finalidade de abastecimento local. No entanto, alguns cultivares estão sendo produzidos em maior escala, como o milho, sendo realizados os testes para pesquisa de micotoxinas apenas em lotes que serão exportados. Como houve uma cheia histórica na região, despertou o interesse dos pesquisadores em verificar se esta situação atípica influenciou na qualidade e segurança dos alimentos.

A pesquisa indicou que mesmo após período de longa umidade relativa, poucas amostras apresentaram índices mais elevados de fumonisinas, com potencial carcinogênico, no entanto, as amostras que apresentaram maiores índices de contaminação tinham destino para o consumo animal, estando abaixo da legislação permitida para este fim.

Novas pesquisas, como análise de sujidades, métodos rápidos para detecção de micotoxinas a serem realizados na recepção das matérias primas, evitando a mistura de grãos saudáveis com grãos contaminados nos silos e métodos de inativação de micotoxinas, devem ser realizadas, visando a qualidade dos alimentos, menores riscos à saúde do consumidor, além de minimizar perdas econômicas para o agronegócio.

APÊNDICES

**APÊNDICE I – Resumo apresentado na SCATA 2015 – UFSC/CCA
MICROBIOTA NATURAL DO MILHO APÓS PERÍODO
CHUVOSO EXTREMO EM RONDÔNIA, NORTE DO BRASIL**

VALMORBIDA, R. ¹; SOARES, C. E. ¹; YANEZ, M. M. O. ¹; SAVI, G. D. ¹; NASCIMENTO, P. N. ²; SCUSSEL, V. M. ¹

¹Laboratório de Micotoxilogia e Contaminantes Alimentares (LABMICO), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. E-mail:

roberta_valmorbida@yahoo.com.br ²Graduanda em engenharia agrônoma, Faculdade da Amazônia (FAMA), bolsista PIBIC, EMBRAPA Milho e Sorgo, Vilhena, Rondônia, Brasil.

O estado de Rondônia (RO) fica localizado no norte do país, integrante da Amazônia Ocidental, com rica bacia hidrográfica e clima quente o ano todo, amenizado apenas no período chuvoso, conhecido como inverno amazônico. No ano de 2014, houve uma grande cheia, causada por precipitações excedentes nas nascentes (Peru e Bolívia) do Rio Madeira, principal afluente da capital de RO. Contudo, a mesma condição climática, com alta umidade e temperatura, favorece o desenvolvimento de fungos nos grãos colhidos e armazenados. Geralmente a contaminação por fungos em grãos e sementes, inicia-se ainda no campo e prossegue nas etapas posteriores à colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho no mundo e RO tem interesse no cultivo, boa parte da sua produção é exportada. O excedente é comercializado para consumo humano e animal, sendo a maior produção do estado concentrada no sul do estado, onde há maior infraestrutura para armazenagem de grãos secos. Foram coletadas amostras após o período da enchente, julho (safrinha) até dezembro (safra), com posterior envio para o laboratório, onde foram realizados os testes de umidade e atividade de água (a_w). No que diz respeito à umidade relativa e a_w , as amostras foram consideradas satisfatórias (dentro dos padrões estabelecidos), portanto, seguras para o consumo. O teor de umidade encontrado variou de 10,1 a 16,1%, enquanto que para a_w os valores médios variaram entre 0,5 e 0,8. A análise micológica seguiu a técnica da *contagem total de fungos, isolamento das colônias e Identificação das espécies*. Os fungos estavam presentes em 94,76% das amostras, sendo que entre eles, foram

isolados 5 gêneros e 17 espécies, com uma prevalência de *Fusarium* (70%), sendo encontrado também *Aspergillus* (20%), *Penicillium* (6,4%) e outros (3,6%). Entretanto a contagem total máxima observada dos fungos foi de **$3,4 \times 10^2$ UFC/g**, estando abaixo do limite máximo fixado pela legislação ($< 1 \times 10^3$).

PALAVRAS-CHAVES: Amazônia, umidade, fungos e segurança.

**APÊNDICE II – Resumo II apresentado na SCATA 2015 –
UFSC/CCA**

**INFLUÊNCIA DO CLIMA NA CLASSIFICAÇÃO DO MILHO
APÓS CHEIA HISTÓRICA NO ESTADO DE RONDÔNIA,
NORTE DO BRASIL**

VALMORBIDA, R.¹; SOARES, C. E.¹; RUNTZEL, C. L.¹;
NASCIMENTO, P. N.²; SCUSSEL, V. M.¹

¹Laboratório de Micotoxilogia e Contaminantes Alimentares
(LABMICO), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,
Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina,
Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. E-mail:

roberta_valmorbida@yahoo.com.br ²Graduanda em engenharia
agronômica, Faculdade da Amazônia (FAMA), bolsista PIBIC,
EMBRAPA Milho e Sorgo, Vilhena, Rondônia, Brasil.

O estado de Rondônia (RO) está localizado na Amazônia Ocidental, apresenta um clima equatorial, com temperatura média anual entre 24°C e 26°C. A estação seca é de curta duração (jul. e ago), sendo a mais quente e o período chuvoso apresenta elevados índices de precipitação (nov. a abr). Em 2014, um volume de chuvas acima da média nas nascentes (Bolívia e Peru) do rio Madeira, elevou para 19,6 m o nível do rio, no leste de RO. As regiões de clima quente permitem a produção agrícola de milho o ano todo. A mesma condição climática (alta umidade e temperatura), favorece o ataque de pragas (insetos / fungos) nos grãos armazenados. Amostras de milho seco foram coletadas de forma randômica, em unidades armazenadoras, no município de Vilhena. Os dados edafoclimáticos foram obtidos no banco de dados do Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, referentes à temperatura (máx., méd. e mín.), precipitação e umidade relativa do ar (UR), devido ao interesse de monitoramento das variações de temperatura (mín. 13°C com fenômeno de friagem e máx. 39°C) e UR. Tais condições propiciam a depreciação da qualidade do milho pelo desenvolvimento fúngico, formação de grãos fermentados e ardidos ainda no campo. De acordo com a classificação obtida 11,8% (n=43) eram de Tipo 1 (sadios), 8,0% de Tipo 2 (até 10% avarias), 26,3% de Tipo 3 (até 15% avarias) e 10,5% *Fora de Tipo - FT* (presença de carunchos e larvas). De acordo com a legislação brasileira, o milho que apresentar tal classificação (*FT*: presença de insetos vivos) deve ser expurgado antes da comercialização,

devendo ser processado para o consumo humano. Das amostras destinadas à alimentação animal 40,8% (n=33) foram classificadas como *FT* (presença de insetos vivos e grãos avariados). Esse último, se refere às amostras coletadas após o período atípico chuvoso (final da safra), onde restaram apenas grãos de baixa qualidade, o que indica que a alta UR combinada com temperaturas médias elevadas influenciaram na qualidade do milho.

PALAVRAS-CHAVES: Região Norte, umidade, armazenagem, milho.

ANEXO

ANEXO I - Metodologia de coleta de amostras, Ministério de Agricultura e Pesquisa Agropecuária (MAPA)

SEÇÃO III – tópico 11.

11. COLETA DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

Os procedimentos ora estabelecidos foram aplicados em lotes ou sub-lotes de amostras de produtos vegetais objetos de controle oficial (monitoramento e investigação) no mercado interno (comercialização interna e produtos importados) e que se apresentam acondicionados, conforme descrição nos itens abaixo enumerados.

11.1. PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE AMOSTRAS DE GRÃOS E FARINÁCEOS ACONDICIONADOS EM SACOS OU A GRANEL

As amostras devem ser coletadas durante o processo de empacotamento, ou em lotes armazenados (silo) ou em armazéns convencionais, durante a carga ou descarga ou transilagem.

O lote em movimento e a situação ideal para a coleta, devendo ser realizada antes do empacotamento, nas esteiras e dentro das beneficiadoras, durante a montagem ou desmontagem das pilhas, ou durante a formação dos lotes ou nas operações de carga e descarga do produto, bem como ova e desova de contêiner, conforme critérios do Quadro I.

Quadro I. Amostragem para análise de micotoxinas em grãos e farináceos a granel ou ensacado

Lote (kg)	Massa dos sub-lotes ou n. sub-lotes	Nº de Incrementos (100g)	Massa da Amostra Global* (kg)	Massa da Amostra de Controle Oficial	
				Amostra Micotoxinas* (kg)	Amostra de Classificação* (kg)
>1500	500 toneladas	130	13	10	
>300 e ≤ 1500	3 sub-lotes	130	13	10	
>100 e ≤ 300	100 toneladas	130	13	10	
>50 e ≤ 100		130	13	10	
>20 e ≤ 50		130	13	10	3
>10 e ≤ 20		90	13	10	
>3 e ≤ 10		70			
>1 e ≤ 3	–	Amostrar massa ou unidades suficientes para a massa da amostra global			
>0,5 e ≤ 1					
>0,05 e ≤ 0,5					

Fonte: Regulamento CE No 401/2006.

Quando não for possível proceder a movimentação do lote, devem ser retirados incrementos distribuídos de forma sistemática (verificar ilustrações nos exemplos abaixo) no lote estático. O lote deve ser previamente organizado de modo a permitir que o amostrador circunde toda a pilha de sacos ou possa acessar todas as suas faces.

As amostras de monitoramento do PNCRC/Vegetal deverão ser enviadas aos laboratórios participantes do Plano, levando em consideração a massa da amostra prevista (verificar a coluna “Amostra micotoxinas (kg)” constante no Quadro I).

A massa da amostra prevista na coluna “Amostra de Classificação (Kg) do Quadro I” deverá ser coletada durante a investigação de uma violação do PNCRC/Vegetal, em conjunto com a massa de amostra prevista na coluna “Amostra Micotoxinas (kg) do Quadro I” para fins de efetuar a fiscalização da classificação dos produtos que possuem padrão oficial de classificação.

Grãos e Farináceos Empacotados em Embalagem de 250g, 500g e 1 kg

Coletar as amostras nas gondolas ou estoques dos supermercados ou armazenados nos depósitos ou armazéns no âmbito de atacado, conforme critérios do Quadro II.

Grãos e Farináceos empacotados em embalagem de 2 kg e 5 kg

Coletar as amostras nas gondolas ou estoques dos supermercados ou armazenados nos depósitos ou armazéns no âmbito de atacado, conforme critérios do Quadro III.

QUADRO II. Amostragem para determinação de micotoxinas em grãos e Farináceos no varejo em pacotes de 250 g, 500g e 1 Kg.

Lote (kg)	Nº de pacotes de 250g	Nº de Pacotes de 500 g	Nº de Pacotes de 1 kg	Massa da Amostra Global* (kg)	Massa da Amostra de Controle Oficial	
					Amostra Micotoxinas* (kg)	Amostra de Classificação* (kg)
≤ 50	16	8	4	4	1	
51 – 500	16	8	5	4	1	
501 – 1000	20	10	10	4	1	
1001 – 3000	40	20	10	5	2	
3001 – 10000	80	40	20	7	4	3
10001 – 20000	120	60	30	9	6	
20001 – 50000	200	100	50	13	10	

(*) valores mínimos

QUADRO III. Amostragem para determinação de micotoxinas em grãos e farináceos no varejo em pacotes de 2 kg e 5 kg

Lote (kg)	Nº de pacotes de 2 kg	Nº de Pacotes de 5 kg	Massa da Amostra Global* (kg)	Massa da Amostra de Controle Oficial	
				Amostra Micotoxinas* (kg)	Amostra de Classificação* (kg)
≤ 1000	3	1	4	1	
1001 – 3000	3	1	5	2	
3001 – 10000	4	2	7	4	3
10001 – 20000	5	2	9	6	
20001 – 50000	7	3	13	10	

(*) valores mínimos, com acréscimo máximo de até 100g Fonte: Regulamento CE No 401/2006

ANEXO II – Instrução normativa nº 60/2011, MAPA para Classificação de Milho

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO

GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 22 DE DEZEMBRO DE 2011
O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87,
parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto na
Lei nº 9.972, de 25 de maio de 2000, no Decreto nº 6.268, de 22 de
novembro de 2007, no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na
Portaria MAPA nº 381, de 28 de maio de 2009, e o que consta do
Processo nº 21000.010492/200968, resolve:

Art. 1º Estabelecer o Regulamento Técnico do Milho na forma da
presente Instrução Normativa.

Parágrafo único. Este Regulamento Técnico não se aplica ao milho
pipoca, sujeito à regulamentação específica.

CAPÍTULO I - DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 2º O presente Regulamento Técnico tem por objetivo definir o
padrão oficial de classificação do milho, considerando seus requisitos de
identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a
marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do
produto.

Art. 3º Para efeito deste Regulamento Técnico, considerase:

I milho: os grãos provenientes da espécie *Zea mays* L.;

II grãos carunchados: os grãos ou pedaços de grãos que se apresentam
atacados por insetos considerados pragas de grãos armazenados em
qualquer de suas fases evolutivas;

III grãos avariados: os grãos ou pedaços de grãos que se apresentam
ardidos, chochos ou imaturos, fermentados, germinados, gessados e
mofados:

a) ardidos: os grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento
total, por ação do calor, umidade ou fermentação avançada atingindo a
totalidade da massa do grão, sendo também considerados como ardidos,
devido à semelhança de aspecto, os grãos totalmente queimados;

b) chochos ou imaturos: os grãos desprovidos de massa interna, enrijecidos e que se apresentam enrugados por desenvolvimento fisiológico incompleto, sendo que os grãos pequenos e os de endosperma córneo (ponta de espiga) não serão considerados chochos ou imaturos, sendo considerados grãos normais;

c) fermentados: os grãos ou pedaços de grãos que apresentam escurecimento parcial do germe ou do endosperma provocado por processo fermentativo ou calor, sendo também considerados como fermentados, devido à semelhança de aspecto, os grãos que se apresentam parcialmente queimados; grãos que apresentam plúmula roxa, como característica varietal, não são considerados grãos defeituosos;

d) germinados: os grãos ou pedaços de grãos que apresentam início visível de germinação;

e) gessados: os grãos ou pedaços de grãos que tenham sofrido variação na sua cor natural, apresentando-se de esbranquiçado ao opaco, mostrando no seu interior todo o endosperma amiláceo com cor e aspecto de gesso (farináceo);

f) mofados: os grãos ou pedaços de grãos que apresentam contaminações fúngicas (mofo ou bolor) visíveis a olho nu, independentemente do tamanho da área atingida, bem como os grãos ou pedaços de grãos que apresentam coloração esverdeada ou azulada no germe, produzida pela presença de fungos;

IV grãos quebrados: os pedaços de grãos que vazarem pela peneira de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) de diâmetro e ficarem retidos na peneira de crivos circulares de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro;

V impurezas: pedaços de grãos que vazarem pela peneira de crivos circulares de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro, bem como detritos do próprio produto que ficarem retidos nas peneiras de crivos circulares de 5,00 mm (cinco milímetros) e de 3,00 mm (três milímetros) de diâmetro, que não sejam grãos ou pedaços de grãos de milho;

VI matérias estranhas: os corpos ou detritos de qualquer natureza, estranhos ao produto, tais como grãos ou sementes de outras espécies vegetais, sujidades, insetos mortos, entre outros;

VII matérias macroscópicas: aquelas estranhas ao produto que podem ser detectadas por observação direta, a olho nu, sem auxílio de instrumentos ópticos e que estão relacionadas ao risco à saúde humana, segundo legislação específica;

VIII matérias microscópicas: aquelas estranhas ao produto que somente podem ser detectadas com auxílio de instrumentos ópticos e que estão relacionadas ao risco à saúde humana, segundo legislação específica;

IX organismo geneticamente modificado (OGM): aquele cujo material genético (Ácido Desoxirribonucleico ADN e Ácido Ribonucleico ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética;

X substâncias nocivas à saúde: as substâncias ou agentes estranhos, de origem biológica, química ou física, que sejam nocivos à saúde, tais como: as micotoxinas, os resíduos de produtos fitossanitários ou outros contaminantes, previstos em legislação específica, não sendo assim considerados aqueles cujo valor se verifica dentro dos limites máximos previstos; e XI umidade: o percentual de água encontrada na amostra do produto isenta de matérias estranhas e impurezas, determinado por um método oficial ou aparelho que dê resultado equivalente.

Parágrafo único. Os grãos de milho que apresentarem alterações ou anormalidades não mencionadas neste artigo serão considerados grãos normais.

CAPÍTULO II - DA CLASSIFICAÇÃO E TOLERÂNCIAS

Art. 4º A classificação do milho é estabelecida em função dos seus requisitos de identidade e qualidade.

§ 1º O requisito de identidade do milho é definido pela própria espécie do produto na forma disposta no inciso I do art. 3º desta Instrução Normativa.

§ 2º Os requisitos de qualidade do milho são definidos em função da consistência e do formato, da coloração do grão e dos limites máximos de tolerância estabelecidos na Tabela 1 desta Instrução Normativa.

Art. 5º O milho será classificado em Grupos, Classes e Tipos, conforme o disposto a seguir:

§ 1º O milho, de acordo com a consistência e o formato do grão, será classificado nos seguintes Grupos:

I duro: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com as características de duro, ou seja, apresentando endosperma predominantemente córneo, exibindo aspecto vítreo; quanto ao formato, considera-se duro o grão que se apresentar predominantemente ovalado e com a coroa convexa e lisa;

II dentado: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com as características de dentado, ou seja, com consistência parcial ou

totalmente farinácea; quanto ao formato, considera-se dentado o grão que se apresentar predominantemente dentado com a coroa apresentando uma reentrância acentuada;

III semiduro: quando apresentar o mínimo de 85% em peso de grãos com consistência e formato intermediários entre duro e dentado; e

IV misturado: quando não estiver compreendido nos grupos anteriores, especificando-se no documento de classificação as percentagens da mistura de outros grupos.

§ 2º O milho, de acordo com a coloração do grão, será classificado nas seguintes classes:

I amarela: constituída de milho que contenha no mínimo 95% (noventa e cinco por cento), em peso, de grãos amarelos, amarelo pálido ou amarelo alaranjado; o grão de milho amarelo com ligeira coloração vermelha ou rósea no pericarpo será considerado da classe amarela;

II branca: constituída de milho que contenha no mínimo 95% (noventa e cinco por cento), em peso, de grãos brancos; o grão de milho com coloração marfim ou palha será considerado da classe branca;

III cores: constituída de milho que contenha no mínimo 95% (noventa e cinco por cento), em peso, de grãos de coloração uniforme, mas diferentes das classes amarela e branca; o grão de milho com ligeira variação na coloração do pericarpo será considerado da cor predominante; e

IV misturada: constituída de milho que não se enquadra em nenhuma das classes anteriores.

§ 3º O milho será classificado em 3 (três) Tipos de acordo com a sua qualidade e definidos pelos limites máximos de tolerâncias estabelecidos na Tabela 1 desta Instrução Normativa, podendo ainda ser enquadrado como Fora de Tipo ou Desclassificado:

TABELA 1 Limites máximos de tolerância expressos em percentual (%)

Enquadramento	Grãos avariados	Grãos quebrados	Matérias Estranhas e Impurezas	Carunchados	Ardidos
Tipo 1	1,00	6,00	3,00	1,00	2,00
Tipo 2	2,00	10,00	4,00	1,50	3,00
Tipo 3	3,00	15,00	5,00	2,00	4,00
Fora de Tipo	5,00	20,00	Maior que 5,00	Maior que 2,00	8,00

I será considerado como Fora de Tipo o milho que não atender os parâmetros estabelecidos para o Tipo 3 na Tabela 1 desta Instrução Normativa:

- a) o milho enquadrado como Fora de Tipo por grãos ardidos, total de avariados ou carunchados poderá ser comercializado como se apresenta, desde que identificado como Fora de Tipo, ou poderá ser rebeneficiado, desdobrado ou recomposto para efeito de enquadramento em tipo;
- b) o milho enquadrado como Fora de Tipo por grãos quebrados ou matérias estranhas e impurezas não poderá ser comercializado como se apresenta, devendo ser rebeneficiado, desdobrado ou recomposto para efeito de enquadramento em tipo; e
- c) o milho que apresentar insetos vivos ou outras pragas de grãos armazenados não poderá ser comercializado como se apresenta, devendo ser expurgado ou submetido à outra forma eficaz de controle antes da sua comercialização;

II será desclassificado e proibida a sua comercialização e a sua entrada no País o milho que apresentar na carga, no lote ou na amostra a ser analisada uma ou mais das situações indicadas a seguir:

- a) mau estado de conservação, incluindo aspecto generalizado de mofo ou fermentação;
- b) presença de sementes tratadas ou sementes tóxicas;
- c) odor estranho, impróprio ao produto, que inviabilize a sua utilização para o uso proposto; e
- d) limites de tolerâncias acima do estabelecido para os defeitos ardidos, total de avariados ou carunchados previstos na Tabela 1 desta Instrução Normativa para Fora de Tipo.

Art. 6º Ao ser constatada uma das características desclassificantes do produto, a entidade credenciada para a execução da classificação deverá emitir o correspondente Laudo de Classificação enquadrando o produto como Desclassificado.

Parágrafo único. Na hipótese do caput deste artigo, deve ser informado o fato à Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento SFA, da Unidade da Federação onde o produto se encontra estocado, para que sejam adotados os procedimentos de classificação de fiscalização.

Art. 7º Caberá à SFA da Unidade da Federação adotar as providências cabíveis quanto ao destino do produto desclassificado, podendo para isso articular-se, no que couber, com outros órgãos oficiais.

Art. 8º No caso de o produto desclassificado poder ser utilizado para outros fins que não seja o uso proposto, a SFA da Unidade da Federação deverá estabelecer os procedimentos necessários ao acompanhamento do produto até a sua completa descaracterização ou destruição, se for caso, cabendo ao proprietário do produto ou ao seu representante, além de arcar com os custos pertinentes à operação, ser o seu depositário.

Art. 9º O MAPA poderá efetuar análises de substâncias nocivas à saúde, matérias macroscópicas, microscópicas e microbiológicas relacionadas ao risco à saúde humana, e análise para detecção de OGM, de acordo com a legislação específica, independentemente do resultado da classificação do produto.

§ 1º O produto será desclassificado quando se constatar a presença das substâncias de que trata o caput deste artigo em limites superiores ao máximo estabelecido na legislação específica, ou, ainda, quando se constatar a presença de substâncias não autorizadas para o produto.

§ 2º O ônus das análises a que se refere o caput deste artigo será do responsável pelo produto ou do seu representante.

CAPÍTULO III - DOS REQUISITOS E DOS PROCEDIMENTOS GERAIS

Art. 10. O milho deverá se apresentar fisiologicamente desenvolvido, são, limpo e seco, observadas as tolerâncias estabelecidas na Tabela 1 desta Instrução Normativa.

Art. 11. O percentual de umidade tecnicamente recomendado para fins de comercialização do milho será de até 14,0% (catorze por cento).

§ 1º O milho que apresentar umidade superior à recomendada neste Regulamento Técnico poderá ser comercializado, devendo a informação relativa ao percentual de umidade constar no Documento de Classificação do produto.

§ 2º Caberá às partes interessadas ou envolvidas no processo de comercialização do produto as responsabilidades quanto ao manuseio, uso apropriado e demais cuidados necessários à conservação do produto com umidade acima do previsto no caput deste artigo.

Para maiores informações, na íntegra: Sistema Integrado de Legislação
[http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?met
hod=visualizarAtoPortalMapa&chave=1739574738](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?met
hod=visualizarAtoPortalMapa&chave=1739574738) 1/6
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento BINAGRI
SISLEGIS

ANEXO III – Confirmação da submissão do artigo I

The screenshot shows a web browser window with the address bar displaying https://www.evise.com/evise/faces/pages/homepage/homepage.jspx?_adf.ctrl-state=g4yor4qkt_763. The page header features the "Food Microbiology" logo and the EVISE logo. A navigation bar includes "Home" and "Reports" tabs. The main content area is titled "My Author Tasks" and contains a blue button labeled "Start New Submission" and a link that says "Click here to view your submissions with a final decision". Below this, a section titled "My Submissions with Journal (1)" displays a submission card for the article "QUALITY AND SAFETY OF MAIZE (Zea mays L.) GRAINS FROM THE STORAGE RONDONIA STATE UNITS - NORTHERN BRAZIL". The submission card includes the following details: "Current Status: With Editor (11/Mar/2016)", "Article Type: Research Paper", "Revision: Original | Version: V0", "Initial Submission Date: 11/Mar/2016", "Editor-in-Chief: Mary Lou Tortorello", and "FM_2016_213". The Windows taskbar at the bottom shows the system clock as 13:20 on 11/03/2016, along with various application icons and system tray icons.

Homepage x

← → https://www.evise.com/evise/faces/pages/homepage/homepage.jspx?_adf.ctrl-state=g4yor4qkt_763

Food Microbiology

Roberta Valmorbidia | Log Out | Help EVISE

Home Reports

My Author Tasks

[Start New Submission](#) [Click here to view your submissions with a final decision](#)

My Submissions with Journal (1)

QUALITY AND SAFETY OF MAIZE (Zea mays L.) GRAINS FROM THE STORAGE RONDONIA STATE UNITS - NORTHERN BRAZIL

Current Status: With Editor (11/Mar/2016)

FM_2016_213
Editor-in-Chief: Mary Lou Tortorello

Article Type: Research Paper
Revision: Original | Version: V0
Initial Submission Date: 11/Mar/2016

PT 13:20 11/03/2016